DER EINFLUSS VON PROLAKTIN AUF DEN TRANSEPITHELIALEN NATRIUM-TRANSPORT ISOLIERTER AMPHIBIENMEMBRANEN

W. Knoll.

München 1979

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians Universität zu München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Der Einfluss von Prolaktin auf den transepithelialen Natrium-Transport isolierter Amphibienmembranen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der gesamten Medizin
an der
Ludwig-Maximilians Universität zu München

vorgelegt von
W e r n e r K n o l l
aus
München
1979

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Ludwig-Maximilians Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Eigler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 06. 12. 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Der Einfluß von Prolaktin auf den Transepithelialen Natriumtransport isolierter Amphibienmembranen

Seite

I, Einleitung und Problemstellung 1

II, Transepithelialer Elektrolyttransport-
Theoretische Aspekte und Literaturübersicht

A) Elektrophysiologische Erscheinungen 6

B) Membrantransport 8

C) Enzymatische und hormonale Einflüsse
auf den Membrantransport

1) Na^+-K^+- ATPase 14

2) Wirkungen des ADH 16

D) Prolaktin

1) Allgemeine Bedeutung 19

2) Das Problem der eigenständigen osmoregulatorischen Prolaktinwirkung 20

III, Material und Methoden

1) Versuchstiere 22

2) Präparation 22

3) Versuchsanordnung 23

4) Verwendete Lösungen und Substanzen 26

5) Versuchsprotokoll 29

IV, Ergebnisse

A) Radioimmunologische Bestimmungen

1) Prolaktin 32

2) ADH 32

B) Prolaktinwirkungen an der Froschhaut

1) Nachweis der Prolaktinwirkung 34

2) Einfluß einer 12-stündigen Inkubation der Membranen in Glucose-Ringer-Lösung 38

3) Einfluß der Vorinkubation ohne Glucose und des Glucosezusatzes bei der Ausführung des Prolaktinexperimentes 41

4) Einfluß der Glucoseinkubation auf die ADH-Wirkung; Prolaktin- und ADH-Effekte bei ADH-vorstimulierten Membranen 45

5) Prolaktin- und ADH-Effekte bei prolaktinvorstimulierten Membranen 50

6) Wirkung des internationalen Prolaktinstandards NIH-P-S 12 52

7) Jahreszeitliche Abhängigkeit des Prolaktineffektes 56

C) Prolaktinwirkungen an der isolierten Krötenhaut (Bufo bufo) 58

V, Diskussion 61

VI, Zusammenfassung 78

VII, Literaturverzeichnis 80

I, EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Dem im Jahre 1928 in Rindern und Schafen entdeckten Hypophysenvorderlappenhormon Prolaktin kommt unter allen Hormonen durch sein ausgesprochen breites Wirkungsspektrum eine besondere Bedeutung zu. Zusammen mit dem Wachstumshormon bildet es eine Gruppe von Polypeptiden, die, speziesübergreifend, regulative Aufgaben in den Tierarten wahrnehmen. Humanes Prolaktin wurde 1970 eindeutig identifiziert und im Blut des Menschen als eigenständiges Hormon nachgewiesen. Es besteht aus 198 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 23 000 und drei Disulfidbrücken (Abb. 1). Die hypophysäre Prolaktinsekretion steht unter vorwiegend inhibitorischer hypothalamischer Kontrolle /13, 62,64,103,126,158,195/.

Beim Menschen erstrecken sich die bisher nachgewiesenen Wirkungen des Prolaktin auf die Mammogenese, die Laktation, vermutlich das Amnion, das Gonadensystem und auf die Schwangerschaft. Die hierbei beteiligten Organe sind als Zielstrukturen für das Prolaktin aufzufassen und besitzen beim Säuger hochspezifische Prolaktinrezeptoren /26,86,93,148,149,154,155/. Daneben werden allerdings auch Wirkungen auf den Salz- und Wasserhaushalt diskutiert /18,22,29,118/.

So zeigen Untersuchungen aus der vergleichenden Endokrinologie, daß die osmoregulatorische Funktion des Prolaktin ein phylogenetisch altes Prinzip ist, das schon "an der Basis der Wirbeltierklasse essentielle Aufgaben wahrnimmt" /16/. Es ermöglicht z.B. über seinen Einfluß auf Salz und Wasser transportierende Epithelien einigen salzwasseradaptierten Knorpel- und Knochenfischen das Überleben im

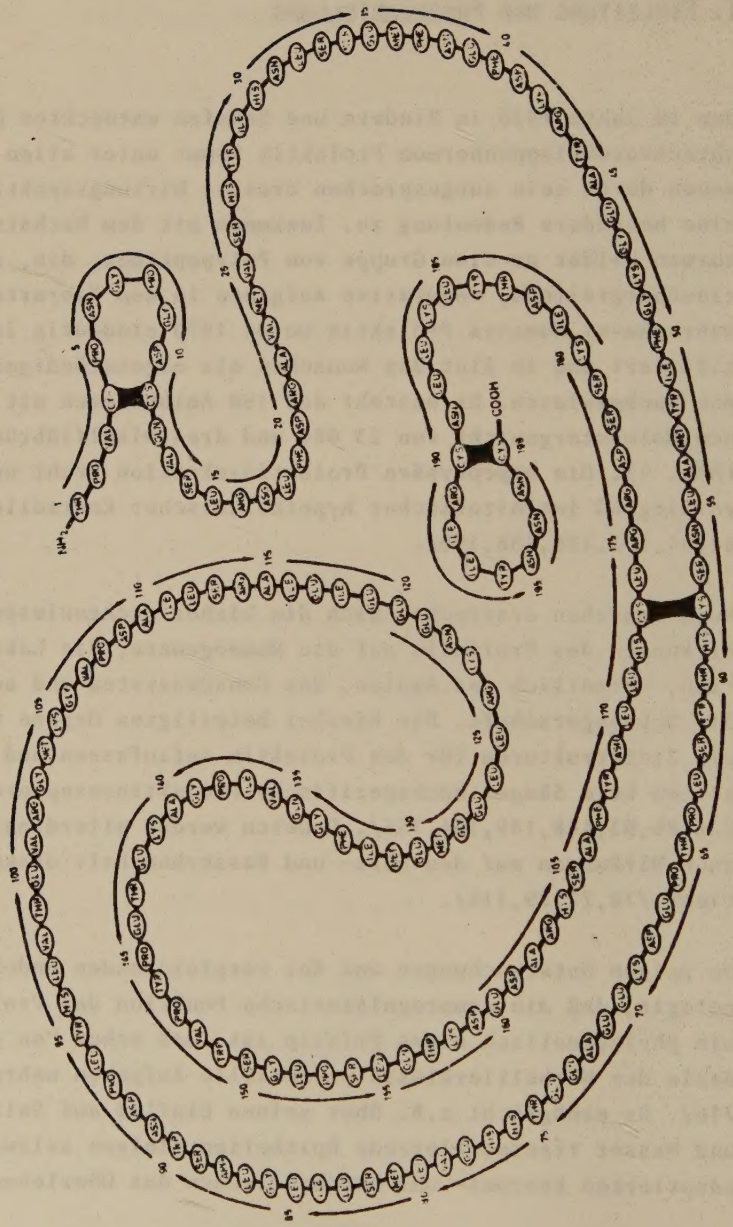


Abb. 1 Strukturformel des ovinen Prolaktin (nach /72/)

Süßwasser /13,27,49,81,90,147/. Auch bei Amphibien tritt eine als "water drive" bekannte, hormongesteuerte Anpassung des tierischen Organismus beim Übergang vom Land in das Wasser als regulatorische Wirkung des Prolaktin stets in Erscheinung, während einige produktive Leistungen des Prolaktin nur im Larvenstadium der Amphibien nachweisbar sind /136,163/.

Das Wesen derartiger Prolaktinwirkungen läßt sich, trotz großer Unterschiede bei verschiedenen Tierspezies, auf ein gemeinsames Prinzip zurückführen, nämlich den Transport von Wasser, Ionen und anderer osmotisch aktiver Teilchen über biologische Membranen: durch Alveolar- und Gangepithelien der Mamma, durch Amnionepithelien an Schwein und Affe, durch intestinale Epithelien vieler Laborsäugetiere, durch das Kropfepithel der Taube, durch die Schwanzhaut der Amphibienlarven und durch Kiemen, Harnblase und äußere Haut einiger Fische /79,80,81,82,92,93,106,168,193/.

Zum großen Teil wurden diese Erkenntnisse durch Experimente an lebenden Tieren gewonnen. Versuche, derartige Mechanismen durch in vitro Experimente an transportaktiven Membranen zu studieren, lieferten Ergebnisse, die zu kontroversen Interpretationen Anlaß gaben /32,89/. Insbesondere stellt sich die Frage nach dem unmittelbaren osmoregulatorischen Effekt von Prolaktin in vitro, der z.B. nach Bern /12/ nicht vorhanden ist.

Danach läßt sich Prolaktin nicht in die große Gruppe der Peptidhormone einreihen, die ihre intrazelluläre Wirkung über c-3',5'AMP als "second messenger" entfalten /12,53,94/.

Die im Hinblick auf Wasser- und Salztransport zum Teil

widersprüchlichen Befunde werden heute oft damit erklärt, daß die in vivo beim Menschen und einigen Laborsäugetieren, aber auch in vitro an Amphibien gefundenen spezifischen Wirkungen auf den Osmomineralhaushalt nicht von Prolaktin selbst, sondern von den in den derzeit verfügbaren Prolaktinpräparationen als "Verunreinigung" enthaltenen neurohypophysären Oktapeptiden, insbesondere von Vasopressin, ausgehen /9,12,77,181,182/. Der Einfluß dieses Hormons auf den Natriumtransport und die Wasserpermeabilität, aber auch auf zelluläre Veränderungen an Bauchhaut und Harnblase von Amphibien, ist durch eine Vielzahl von Arbeiten belegt und analysiert worden, z.B. /5,10,25,41,63,73,74,99/.

Verschiedentlich wurde auch ein direkter Einfluß des Prolaktin auf die Na^+-K^+- ATPase, dem Korrelat der zellulären "Ionenpumpe", angegeben /53,54,107,135/. Ein vasopressinunabhängiger und möglicherweise unspezifischer Wirkmechanismus auf den Salz- und Wasserhaushalt könnte daher in diesem Zusammenhang über prolaktininduzierte intrazelluläre Stoffwechselprozesse vermittelt werden, die auch an Amphibienmembranen Einfluß auf die Na^+-K^+- ATPase nehmen.

Isolierte Amphibienmembranen haben seit der Einführung der sog. Kurzschlußstromtechnik durch Ussing /174,175,179/ für die Analyse transepithelialer Wasser- und Elektrolytbewegungen außerordentlich große Bedeutung erlangt. Im Hinblick auf die oben diskutierten Daten wurde daher in der vorliegenden Arbeit versucht, mittels dieser genau definierbaren experimentellen Anordnung der Frage nach einer eigenständigen Prolaktinwirkung auf den gerichteten transepithelialen Salz- und Wassertransport erneut nachzugehen und sie - im positiven Fall - von den Wirkungscharakteristika des Antidiuretischen Hormons (ADH) abzugrenzen. Dabei gestattet es dann das verwendete experimentelle Modell, beobachtete hormonale Wirkungen als Einfluß auf den

transepithelialen Natriumtransport zu interpretieren (s.S. 7f).

Der transepitheliale Natriumtransport ist ein sehr komplexer, hormonal regulierbarer Vorgang auf enzymatischer Grundlage, dessen Erforschung mit elektrophysiologischen Methoden an vielen Epithelstrukturen zur Entwicklung von Membranmodellen geführt hat. Es erscheint daher zweckmäßig, die für die vorliegende Arbeit relevanten Grundlagen zunächst zu erläutern.

II, Transepithelialer Elektrolyttransport - Theoretische Aspekte und Literaturübersicht

A) Elektrophysiologische Erscheinungen

Aufgrund der Ladung der wichtigsten osmotisch wirksamen Teilchen Na^+,K^+ und Cl^- erhält deren Transport die Qualität eines elektrischen Stromes, der nach dem Ohm'schen Gesetz an einem Widerstand eine elektrische Spannung aufbaut, die z.B. als transepitheliale Potentialdifferenz an biologischen Membranen - und damit als Ausdruck intakter Transportprozeßmechanismen - in Erscheinung tritt und gemessen werden kann. Beispielsweise läßt sich an der Bauchhaut von Amphibien und anderen epithelialen Membranstrukturen (u.a. Bauchhaut und Harnblase von Kröten) die Größe des Ladungsstromes, der Ursache der elektrischen Membranassymmetrie, experimentell ermitteln, wenn durch einen definierten Elektronenstrom, der dem "biologischen" Strom dem Betrage nach gleich, der Richtung nach aber entgegengesetzt ist, diese Potentialdifferenz auf Null kompensiert und damit die treibenden Kräfte für passive Ionenströme eliminiert werden. Wenn nun dieser von außen aufgeprägte Strom - wie bei der in vorliegender Arbeit untersuchten Tierspezies - dem Strom des aktiv transportierten Natrium ladungsäquivalent ist, dann besteht die Beziehung

1 µVal Na^+/sec ≙ 9.652×10^4 µA *)

---

*) *Zur Berechnung: 1 Mol einwertiger Na^+-Ionen enthält 6.052×10^{23} Ionen (Loschmidtsche Konstante) zu je 1.602×10^{-19} Asec (elektrische Elementarladung), also insgesamt 9.652×10^4 Asec. In einer Sekunde fließt demnach ein Natriumstrom von 9.652×10^4 A.*

Den experimentellen Beweis für die Richtigkeit dieser Überlegungen erbrachte Ussing /174,175/ durch die Messung bidirektionaler Fluxraten von radioaktiv markiertem Natrium in der "kurzgeschlossenen" isolierten Bauchhaut des Frosches. Diese inzwischen als klassisch zu bezeichnenden Experimente bilden heute die Grundlage für die allgemein akzeptierte Gleichsetzung von Kurzschlußstrom und Natrium-Netto-Transport bei Membranen, deren Potential aus der aktiven Bewegung nur dieser einen Ionenart resultiert.

Somit läßt sich ein wesentlicher Aspekt osmoregulatorischer Aktivität, nämlich der transepitheliale Natriumtransport, mit Hilfe dieser "Ussing'schen Kurzschlußstrommethode" experimentell an solchen Membranstrukturen verfolgen, für die die Gültigkeit obiger Beziehung nachgewiesen ist, d.h. der Kurzschlußstrom (KSS) als Maß für den transepithelialen Natriumnettofluß gelten darf. Insbesondere erlaubt diese Versuchsanordnung, auf einfache Weise Substanzen, die das elektrophysiologische Verhalten der Membranen beeinflussen, auf ihren Wirkmechanismus hin zu untersuchen. Auf diese Weise wurde eine Fülle von Daten unter kontrollierten Versuchsbedingungen erarbeitet, die wesentlich zur Entwicklung neuer Modelle der Membranphysiologie beigetragen haben.

Neben diesen elektrophysiologischen Grundlagen erscheint jedoch im Hinblick auf die Problemstellung der hier vorgelegten vergleichenden Untersuchung hormonaler Einflüsse auf den Natriumtransport an Amphibienmembranen für das Verständnis zellulärer Hormonwirkungen auch ein kurzer Abriß neuerer Entwicklungen auf dem Gebiet von Membrantransportprozessen angebracht.

B) Membrantransport

Mit den von Koefoed-Johnson /95/ und Ussing /179/ formulierten Grundlagen für das Verständnis der transepithelialen Potentialdifferenz und des dem Natriumnettotransport über diese Amphibienmembranen äquivalenten Kurzschlußstromes kann, bei Betrachtung des gesamten transepithelialen Natriumtransportes, nur summarisch Aufschluß über die durch experimentelle Manipulation modifizierten Eigenschaften der Zellmembran und die aktuelle Aktivität des Transportvorganges erhalten werden. Die Froschhaut besteht aber aus geschichteten Zellverbänden in der Anordnung von außen nach innen: stratum corneum, str. granulosum, str. spinosum, str. germinativum und Serosa, und schon Engbaek et al. /48/ fanden bei intramembranalen Mikroelektrodenversuchen zwei Potentialsprünge, die sie der Epidermis und der Verbindung zwischen Epidermis und Corium zuordneten.

Die Untersuchung von intraepithelialen und gezielt intrazellulären Potentialen, die Messung der entsprechenden Kurzschlußströme, die Darstellung und Ausmessung der Transporträume für Natrium und schließlich die autoradiographische Markierung der Stellen, auf die sich die aktiven Transportschritte ("Natriumpumpen") verteilen, hat zu einer Differenzierung der Beschreibung des Natriumtransportes geführt: danach dringt Natrium durch die apikale, die an der Außenseite der Epithelzelle gelegene, Membran der transportaktiven Zelle der äußersten lebenden Zellschicht des stratum granulosum passiv ein und wird an der laterobasalen Zellseite aktiv in Richtung der tiefer liegenden Zellschichten mit Hilfe des dort lokalisierten aktiven Natriumtransportmechanismus wieder aus der Zelle befördert.

Nach Erlij /50/ und Martinez-Palomo et al. /114/ stellen die "tight-junctions" zwischen den Zellen eine für kolloidales ^{140}Lanthan und Ruthenium-Red unüberwindliche Diffusionsbarriere dar, wie elektronenoptische Studien an der Froschhaut eindrucksvoll zeigen. Vermutlich gilt dies auch für andere Ionen, so daß Natrium zumindest die erste Zellschicht auf transzellulärem Weg und nicht parazellulär durchwandert.

Da das extrazelluläre Natrium über die apikale Zellmembran, deren Permeabilität pharmakologisch beeinflußt werden kann, in die Zelle eindringt, ist der Schritt des Natriumeinstromes ein wichtiger limitierender Faktor für den transepithelialen Transport /69,141/. Wird der Natriumeinstrom in die Zelle durch Amilorid, das den Widerstand der apikalen Membran sehr stark erhöht, nicht aber die Transportkapazität der "Natriumpumpen" erniedrigt, oder auch durch TAP (Triaminopyrimidin) gehemmt, so resultiert ein spontaner, totaler Abfall des Kurzschlußstromes /35,43,55/. Hemmt man umgekehrt die "Natriumpumpen" mit Ouabain (g-Strophantin), tritt eine Reduktion der Hyperpolarisation ein und die Halbwertszeit des Auswasches von ^{22}Natrium verlängert sich auf etwa 300%. Dabei bleibt das über die epitheliale Zellseite austauschbare Natrium unverändert, während das über die serosale Seite austauschbare Natrium als Folge der ungenügenden Natriumausschwemmung an den serosalen Zellmembranen bei unveränderten Einstrombedingungen ansteigt /102,125/.

Verschiedene weitere Untersuchungen legen nahe, daß das von den Zellen des stratum granulosum aufgenommene Natrium durch relativ widerstandsarme interzelluläre Verbindungen zu den tiefergelegenen Zellen gelangt und von dort aktiv ausgestossen wird. Somit verhält sich, hinsichtlich des Natriumtransportes, die gesamte Haut wie ein funktionelles Synzytium /40,120,140,178/.

Mit Hilfe von ^{3}H-Ouabain, das sich spezifisch an das Transportenzym Na^{+}-K^{+}- ATPase bindet, wurden "Natriumpumpen" bei fast allen untersuchten transportaktiven Geweben an den laterobasalen Zellmembranen gefunden; nicht aber an den apikalen Membranen der Zellen des stratum granulosum und den basalem Membranen der Zellen des stratum germinativum /56,119/. Die Funktion und Lokalisation der "Pumpen" waren auch bei Geweben mit unterschiedlicher Ausprägung der Transportaufgaben, wie hyperosmotische und isotone Absorption oder hypertone und isotone Sekretion, immer wieder uniform /42,65,117/. Allerdings kann das Natrium auch parazellulär zu tieferen Zellschichten vordringen, und diesem "Shuntweg" wurde im Blasenepithel der Kröte eine Kontrollfunktion über den aktiven Transport zugeschrieben /138,139/.

Dem transzellulären Ionentransport entspricht auch eine Fülle morphologischer Erscheinungen, deren Ausprägungen mit den simultan gemessenen elektrischen Phänomenen an der Membran häufig eng korreliert sind /121,184,185,186/.

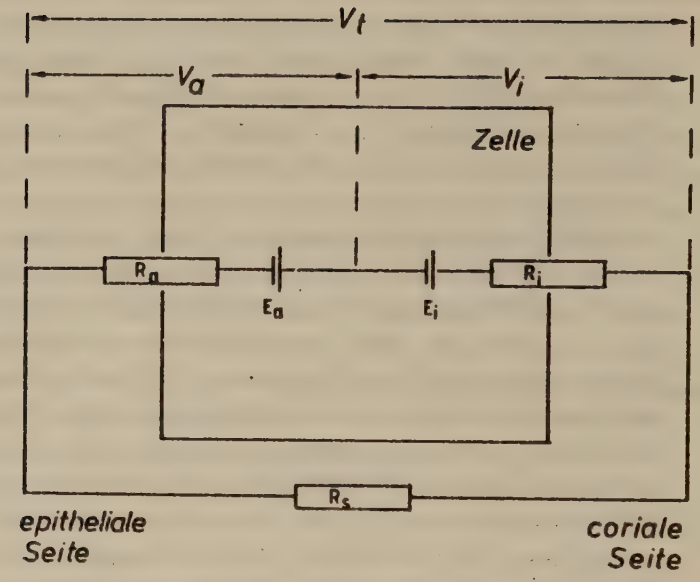
In der Regel spielt der aktive Transport für Anionen an der Amphibienmembran keine Rolle. Dieser vorwiegend passiv ablaufende Vorgang steht jedoch in enger gegenseitiger Wechselbeziehung zum aktiven Natriumtransport /21,48,50, 57,95/.

Wie bereits erwähnt, ist der Einfluß des ADH auf transepitheliale Wasser- und Elektrolytbewegungen eingehend untersucht worden. So impliziert eine phänomenologische Beschreibung der Wirkung der hypophysären Hormone auf die Zellen transportaktiver Epithelien, daß ADH, Oxytocin und - als second messenger - c-3′:5′ AMP sicher an der apikalen, aber auch an der basalen Zellmembran wirken: sie fördern

an der apikalen Seite den Natriumeinstrom und stimulieren an der basalen Seite den aktiven Natriumausstoß /1,2,24,28, 71,123,124,144/. Nagel /124/ erklärt an einem elektrischen Äquivalenzbild für den transzellulären Transport die Wirkung des ADH auf die Zellmembran (Abb. 2a): hier entsprechen zwei in Serie geschaltete Widerstände mit ihren jeweiligen elektromotorischen Kräften den apikalen und basalen Membranwiderständen mit ihren Gleichgewichtspotentialen, während nach Heiman et al. /78/ der apikale Widerstand aus zwei getrennten, parallelen, je in Serie mit einer zugehörigen Diode geschalteten Widerständen besteht, die die Einzelmembranwiderstände für den Natriumeinstrom und den Natriumausstrom symbolisieren (Abb. 2b). Das ADH ist nun in der Lage, neben einem Abfall des intrazellulären Potentials unter Kurzschlußstrombedingungen auf 40%, bei gleichzeitigem Anstieg des Kurzschlußstromes auf 160% des jeweiligen Kontrollwertes, den Widerstand der apikalen Seite unter den der basalen Seite zu senken, der unter ADH ansteigt /124/. Ähnliche Untersuchungen liegen für Prolaktin noch nicht vor.

Die Regulation biologischer Transportprozesse geschieht jedoch nicht nur durch übergeordnete Hormonwirkungen, sondern auch durch direkte Rückkopplung über den intrazellulären und extrazellulären Natriumgehalt, durch Beeinflussung des Membranwiderstandes für Anionen, und auch der Größe des Zellvolumens wird eine regulative Funktion zugeschrieben /177/.

In Tabelle 1 ist dargestellt, wie aus den Veränderungen der Potentialdifferenz und des Kurzschlußstromes, die mit Hilfe der "Ussing'schen Kurzschlußstrommethode" gemessen werden, auf Änderungen des aktiven Natriumtransportes und der Permeabilität dieser Membran für Anionen geschlossen werden kann.



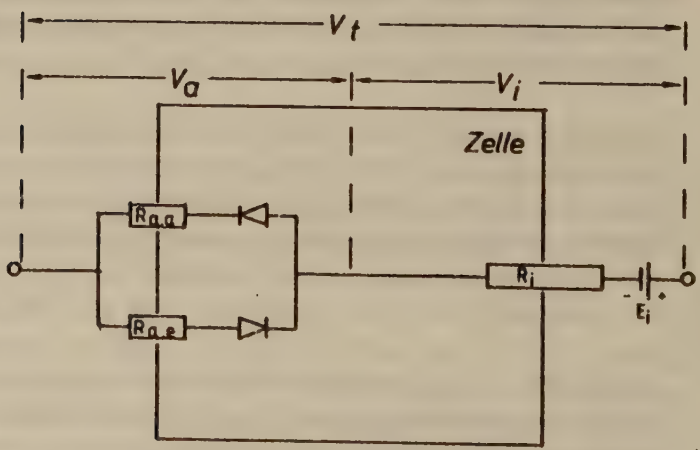


Abb. 2 Elektrische Äquivalenzbilder der transportaktiven Zelle a) nach /124/, b) nach /78/

R_i Widerstand der basalen Membran, R_a Widerstand der apikalen Membran, E_i Gleichgewichtspotential an der basalen Membran, E_a Gleichgewichtspotential an der apikalen Membran, $R_{a,e}$ Einstromwiderstand für Na an der apikalen Membran, $R_{a,a}$ Ausstromwiderstand für Na an der apikalen Membran

Kurzschlußstrom	Potentialdifferenz		
	nimmt zu	bleibt gleich	nimmt ab
nimmt zu	AT ↑ PA ↑(–)	AT ↑ PA ↑(–)	AT ↑ PA ↑
bleibt gleich	AT – PA ↑	AT – PA –	AT – PA ↓
nimmt ab	AT ↑ PA ↑	AT ↑ PA ↑(–)	AT ↑ PA ↓

Tabelle 1 Grobe summarische Abschätzung der Veränderungen des aktiven Transportes (AT) und der Permeabilität der Anionen (PA) bei Änderungen von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom.

↑ = *Zunahme*, – = *keine Veränderung*, ↓ = *Abnahme*

Neben der Beschreibung der erwähnten elektrophysiologischen Veränderungen an den Zellmembranen und dem Auftreten von Spannungen und Strömen infolge aktiver Transportprozesse liegt eine Reihe von Befunden zur biochemischen Charakterisierung dieser Transportphänomene und von hormonalen Einflüssen auf Zellstoffwechselprozesse vor, die ebenfalls zur Differenzierung möglicher Wirkungen von Prolaktin im Vergleich zu ADH auf zellulärer Ebene beitragen. Hierzu gehören verschiedene enzymatische Reaktionen, insbesondere die Aktivierung des Transportenzyms Na^+-K^+ - ATPase und die Adenylzyklase.

C) Enzymatische und hormonale Einflüsse auf den Membrantransport

1) Na^+-K^+- ATPase

Die für den aktiven Transport notwendige Energie steht in chemisch gebundener Form als ATP und seine Basenäquivalente zur Verfügung: ATP wird im oxidativen Stoffwechsel über den Krebszyklus, aber auch durch anaerobe Glykolyse gebildet /84,100,110,176,196/. Das Bindeglied zwischen aktiver Natriumbewegung und dem Energiesubstrat ist ein ATP in ADP und organischen Phosphor spaltendes und nur von Natrium, Kalium und Magnesium abhängiges und durch diese Ionen aktivierbares, dimeres Enzym, die Na^+-K^+- aktivierbare ATPase oder Na^+-K^+- ATPase. Sie ist durch Ouabain spezifisch hemmbar und in praktisch allen Geweben nachweisbar, die funktionell mit aktivem Natriumtransport assoziiert sind /3,6,33,75,76,152,156,167,170/. Die Na^+-K^+- ATPase gilt als das biochemische Korrelat des als "Natriumpumpe" umschriebenen Prinzips, das Natrium in einem bestimmten Ver-

hältnis gegen Kalium über die laterobasale Zellmembran aus dem Zellinneren nach außen befördert, so daß Na^+-K^+- ATPase und "Na-Pumpe" in mancher Beziehung als synonyme Bezeichnungen gelten können. Die Gewebskonzentrationen der Na^+-K^+- ATPase scheinen sowohl von Umgebungsfaktoren abzuhängen, wie Temperatur oder Adaptation an Salzwasser, als auch im Säugetierorganismus durch Hormone beeinflußt zu werden /11,107,160,180/.

Ein weiteres Enzym, die intramembranal lokalisierte, ebenfalls von Mg^{++} oder Mn^{++} abhängige Adenylzyklase, die das energiereiche ATP in das zyklische Nukleotid c-3′:5′ AMP und Pyrophosphat spaltet, wurde in praktisch allen tierischen Geweben nachgewiesen und ist durch sehr viele Hormone, insbesondere ADH, stimulierbar /23,36,70,122,165/. Die Aktivierung der Adenylzyklase geschieht durch Ankoppeln einer passenden Molekülgruppe einer pharmakologisch wirksamen Substanz an den Rezeptor einer Zelle, der als räumliches, chemisches und elektrisches Strukturkomplement zur bindenden Molekülgruppe auf der Membranoberfläche definiert ist und der eine notwendige Voraussetzung für die selektive Hormonwirkung ist /88,134/. Das Nukleotid c-3′:5′ AMP aktiviert im weiteren Verlauf Phosphorylasen, stimuliert Proteinkinasen, die Phosphatgruppen von ATP auf Proteine übertragen können und wird durch eine Phosphodiesterase hydrolytisch gespalten. In diesen Abläufen liegt die Verbindung von Hormonwirkung und konsekutiver Verfügbarkeit chemisch gebundener Energie für Transportprozesse. Neben dem c-3′:5′ AMP als intrazellulärem Vermittler vieler Hormonwirkungen spielen in Einzelfällen auch Basenäquivalente des c-3′:5′ AMP, z.B. das c-3′:5′ GMP, eine Rolle /66/.

2) Wirkungen des ADH

Im Gegensatz zu Prolaktin, dessen salz- und wasserkonservierenden Eigenschaften bisher nur bei entwicklungsgeschichtlich alten Wirbeltieren sicher nachgewiesen wurden (s.S. 2f), zeigen die antidiuretischen Oktapeptide von Säugern regelmäßig und uniform auch an Amphibienmembranen Na^+-transportstimulierende Wirkungen. Die ersten Schritte der ADH-Wirkung an transportaktiven Epithelien sind die Aktivierung der Adenylzyklase mit darauf folgender Bildung von c-3′:5′ AMP, aber auch die Anregung des oxidativen Glucosemetabolismus. Durch Gabe von c-3′:5′ AMP lassen sich die Wirkungen der Hypophysenhinterlappenhormone (HHL-Hormone) an der Amphibienmembran, nämlich die Stimulation der transepithelialen Potentialdifferenz und des Kurzschlußstromes, imitieren /8,15,17,20,60,68,94,104,122,130, 131,132,137,153,166,171/.

In den Hypophysen verschiedener Tiergattungen findet man antidiuretische Oktapeptide, deren Strukturen sich zwar bis auf eine Aminosäure gleichen, aber deshalb nicht notwendigerweise kreuzreagieren. In der Gruppe der Säuger herrschen Arginin-Vasopressin und Lysin-Vasopressin (Schwein) vor, während für die Amphibien das Vasotocin spezifisch ist (Abb. 3).

Ein für die Wirkung offensichtlich maßgebendes Strukturmerkmal ist die allen diesen Hormonen gemeinsame intakte Disulfidbrücke zwischen Aminosäure 1 und Aminosäure 6, deren Existenz, dank der hochstabilen sterischen Konformation der HHL-Hormone in Lösung, mit der definierten biologischen Wirkung eng korreliert ist. In welcher Weise allerdings die Zielinformation, nämlich der Natriumtransport, über einen intrazellulären Pool von c-3′:5′ AMP und

A) Vasopressorisch wirksame, antidiuretische Peptide

1) Arginin-Vasopressin

CYS - TYR - PHE - GLN - ASN - CYS - PRO - ARG - GLY - NH_2
1 2 3 4 5 6 7 8 9

2) Lysin-Vasopressin

CYS - TYR - PHE - GLN - ASN - CYS - PRO - LYS - GLY - NH_2

3) Arginin-Vasotocin

CYS - TYR - ILE - GLN - ASN - CYS - PRO - ARG - GLY - NH_2

B) Neutrale, oxytocinähnliche Peptide

1) Oxytocin

CYS - TYR - ILE - GLN - ASN - CYS - PRO - LEU - GLY - NH_2

2) Mesotocin (8-Isoleucin Oxytocin)

CYS - TYR - ILE - GLN - ASN - CYS - PRO - ILE - GLY - NH_2

3) Isotocin (4-Serin, 8-Isoleucin Oxytocin)

CYS - TYR - ILE - SER - ASN - CYS - PRO - ILE - GLY - NH_2

4) Glumitocin (4-Serin, 8-Glutamin Oxytocin)

CYS - TYR - ILE - SER - ASN - CYS - PRO - GLN - GLY - NH_2

Abb. 3 Aminosäuresequenzen der bekannten, aktiven, natürlichen neurohypophysären Prinzipien nach /11/

weitere intermediäre Stoffwechselprozesse biologisch realisiert wird, ist zur Zeit noch Gegenstand der Forschung /83,91,173,188,189,190/.

Aber nicht nur die Aktivierung von Phosphorylasen und Proteinkinasen durch das c-3':5' AMP führt letztendlich zu einer Stimulation von Membrantransportprozessen, sondern auch die Neusynthese von Transportproteinen, wie dies von den Steroidhormonen bekannt ist. Auch das Prolaktin induziert Proteinsynthesen, die im Hinblick auf Transportprozesse von Bedeutung sein könnten (s.S. 19). Speziell über das Aldosteron sind Daten verfügbar, die die Rolle einer vorweg ablaufenden Proteinsynthese für den nachfolgenden aktiven Transport verdeutlichen, aber auch Verbindungen des aktiven Transportes mit dem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel und Zusammenhänge mit dem "Häutungszyklus" von Amphibien aufzeigen /7,31,46,104,128,139,146,161,183/.

Außer ADH und Aldosteron bewirkt noch eine Zahl anderer Hormone einen Anstieg des transepithelialen Natriumtransportes an Häuten verschiedener Amphibien; so Adrenalin bei Rana esculenta, Thyroxin an Bufo bufo und Insulin an Bufo marinus. Aldosteron und Insulin wirken an der Haut von Bufo marinus synergistisch /4/.

Im Gegensatz zu diesen zweifelsfrei erwiesenen Hormonwirkungen müssen jedoch die in vitro als osmoregulatorische Prolaktineffekte an Amphibienmembranen beobachteten Erscheinungen nach Berücksichtigung aller verfügbaren Daten sehr vorsichtig gedeutet werden /12/.

D) Prolaktin

1) Allgemeine Bedeutung

Bei vielen Tieren gehen Änderungen ihrer Serumprolaktinspiegel den osmotischen Änderungen der Umgebung parallel. Umgekehrt ändert sich auch die Serumosmolarität im Zusammenhang mit experimentellen Änderungen der Prolaktinspiegel /81,87,108,127,135,151/. Dabei wird eine direkte Verbindung zur Na^+-K^+- ATPase diskutiert (s.S. 4). Der Zusammenhang zwischen Applikation von Prolaktin und Aktivierung der Na^+-K^+- ATPase sowie die generelle Bedeutung prolaktininduzierter Aktivierung enzymatischer Prozesse wurde durch Untersuchungen der Prolaktinwirkung am Mammagewebe von Säugern bestätigt /14,30,34,51,52,53,54,98,112,142,168/. Die Stimulierung der Na^+-K^+- ATPase geschieht dabei nicht, wie bei ADH, über das c-3′:5′ AMP (s.u.), sondern entweder unmittelbar, oder mittelbar über eine Vermehrung des Enzyms Na^+-K^+- ATPase im Rahmen einer prolaktininduzierten de-novo Proteinsynthese /107,150/. Auch die im Zusammenwirken mit anderen Hormonen (Progesteron, Hydrocortison, Insulin) stattfindende Proteinsynthese bei der Laktation, die vor allem als Expression des Casein-Gens in Erscheinung tritt und in spezialisierten Zellen mit hochspezifischen Prolaktinrezeptoren erfolgt, wird nicht durch zyklische Nukleotide vermittelt, ist aber sehr eng mit transmembranalen Verschiebungen von Natrium und Kalium verknüpft /38,39, 93,116,145,148,149,154,155,156,169,172/.

An Amphibien sind prolaktininduzierte Proteinsynthese und bestimmte osmoregulatorische Eigenschaften des Prolaktin vom Lebensalter der Tiere abhängig und nur im Larvenstadium nachweisbar /47,67,163,191/.

Von verschiedenen Autoren wurde auch der Einfluß des Prolaktin auf den Wassertransport untersucht und dabei von den meisten eine Verminderung der Wasserpermeabilität beobachtet /44,82,92,101,111,113/.

Diesen in vielen Fällen eindrucksvollen Befunden über einen, auch im Zusammenhang mit anderen spezifischen Prolaktinwirkungen erkennbaren Einfluß auf transmembranale Ionenbewegungen, der im wesentlichen auf einer Aktivierung der Na^+-K^+- ATPase beruht, stehen jedoch andere Berichte gegenüber, wonach Prolaktin bezüglich der Osmoregulation und damit des Membrantransportes, keinerlei Wirkung besitzt. Diese Daten werden im folgenden kurz referiert.

2) Das Problem der eigenständigen osmoregulatorischen Prolaktinwirkung

Häufig werden Antidiurese bei Tieren oder Anstieg von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom an Amphibienmembranen nach Prolaktingabe ausschließlich der Wirkung ADH-ähnlicher Substanzen, die in der Prolaktinpräparation enthalten sind, zugeschrieben /22,37,162,181,182/. Einige Autoren finden überhaupt keine osmoregulatorischen Prolaktineffekte, andere weisen eine Stresshyperprolaktinämie unter Versuchsbedingungen im Zusammenhang mit der katecholaminergen Kontrolle der Prolaktinsekretion nach, was Anlaß zu teilweise irreführenden Interpretationen von Experimenten zur Klärung osmoregulatorischer Prolaktinwirkungen gegeben hat /9,85, 96,109,115/. In einem Fall wird von einer Verstärkung der ADH-Wirkung durch Prolaktin berichtet, und vereinzelt findet man Hinweise auf eine eindeutige, direkte Einflußnahme des Prolaktin auf den Osmomineralhaushalt /18,19,29,118,192/.

Die hier im einzelnen aufgeführten Daten zeigen, daß eine eindeutige Antwort auf die Frage nach eigenständiger allgemeiner oder spezifischer osmoregulatorischer Wirksamkeit des Prolaktin bisher nicht möglich ist. Es könnte aber auch sein, daß jahreszeitlich bedingte Faktoren im Lebenszyklus der Tiere, speziell bei Amphibien, die Wirkung der Hormone beeinflussen, so daß sie sich nicht immer nachweisen läßt /45,61,97,129,133/.

Die Auswertung experimenteller Daten wird darüberhinaus dadurch erschwert, daß die derzeit kommerziell erhältlichen Prolaktinpräparationen ganz unterschiedlich große Mengen an ADH als "Verunreinigung" enthalten und daher nur dann miteinander verglichen werden können, wenn diese ADH-Anteile für jede verwendete Charge neu bestimmt werden. Weitgehend gereinigte Prolaktinpräparationen, wie der in dieser Arbeit verwendete NIH Standard (National Institute of Health, Bethesda/Maryland), sind so teuer und kostbar, daß sie für Versuche an Amphibienmembranen, bei denen in Analogie zum ADH primär mit "pharmakologischen" Dosierungen zu rechnen ist, nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Zum sicheren Nachweis eines möglichen Prolaktineffektes wurden daher nicht nur die ADH-Anteile in den Prolaktin-Chargen gemessen bzw. errechnet, sondern auch biologische Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen ADH-Konzentrationen durchgeführt, um mögliche Abhängigkeiten oder gegenseitige Beeinflussungen von Prolaktin und ADH aufdecken zu können.

III. Material und Methoden

1) Versuchstiere

Der Einfluß des Prolaktin auf die elektrischen Membraneigenschaften wurde an der isolierten Bauchhaut von männlichen und weiblichen Fröschen der Spezies Rana temporaria bestimmt, die Wirkung auf den hydroosmotischen Wasserfluß an der Bauchhaut der europäischen Erdkröte Bufo bufo. Versuche mit den Fröschen wurden vom November 1978 bis Juni 1979 durchgeführt und die Tiere während der Versuchszeit ohne Nahrung in einem unbeheizten Kellerraum mit freiem Zugang zu Leitungswasser gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden sie für 24 Stunden bei Zimmertemperatur, ebenfalls mit freiem Zugang zu Leitungswasser, gehalten. Die Kröten, die im Frühjahr 1979 in Ungarn gefangen wurden, waren während der gesamten Zeit im Terrarium bei Zimmertemperatur verwahrt. Als Nahrung dienten Fliegen und Mehlwürmer.

2) Präparation

Die Tiere wurden dekapitiert und das Rückenmark mit einer Sonde zerstört. Anschließend erfolgte die vorsichtige, hauptsächlich stumpfe, bei Fröschen und Kröten in gleicher Weise durchgeführte Präparation der Bauchhaut und nach deren Isolierung eine Spülung in Frosch-Ringer-Lösung. Die Blutgefäße auf der serosalen Seite der Bauchhaut wurden von medial nach lateral ausgestrichen. Für Inkubationsexperimente wurden die Tiere am Vorabend getötet, die Häute dann nach üblicher Präparation ca. 12 Stunden in Glucose-Ringer-Lösung bei starker Luftdurchperlung aufbewahrt und am anderen Morgen in gleicher Weise wie die übrigen Häute untersucht.

3) Versuchsanordnung

Zur Messung des spontanen Membranpotentials (Potentialdifferenz PD) und des Kurzschlußstromes (KSS) fand eine "Ussing-Kammer" Verwendung (Abb. 4). Die isolierte Membran wurde zwischen die beiden konisch ausgebohrten Hälften einer Plexiglaskammer so eingespannt, daß sie nicht flottieren konnte. Die beiden, durch die Haut getrennten und nach deren Orientierung als serosale und epitheliale Badlösung bezeichneten, je 10 ml Frosch-Ringer-Lösung enthaltenden Kammerfüllungen zirkulierten über ein Schlauchsystem und daran angeschlossene, der Pharmakazugabe dienenden Glastrichter, deren Konstruktion einen Verlust der Badlösung durch Überschäumen nach Zugabe eiweißhaltiger Substanzen verhinderte. Die Strömung wurde durch Einpumpen von Luft in einen der Schlauchschenkel erreicht, wobei die durch die Badlösung im Schlauch perlende Luft, wie auch der großflächige Kontakt der Badlösung mit der Umgebungsluft über die Glastrichter, der ausreichenden Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff dienten. Die Effektivität der Strömung bezüglich der Verteilung der Pharmaka konnte durch Zugabe schnell wirkender Substanzen, z.B. Amilorid, sichergestellt werden.

Über ein Auslaufventil ließen sich die Kammern entleeren. Die lichte Weite der Kammeröffnungen betrug zwei Zentimeter und die eingespannte Fläche der Haut 3.14 cm^2.

Mit zwei beiderseits und in unmittelbarer Nähe der Membranen plazierten Ringer-Agar-Brücken wurde das Membranpotential abgeleitet und durch zwei, mit den Enden dieser "Spannungsbrücken" über eine 3-molare KCl-Lösung in Verbindung

stehende Kalomelelektroden (Fa. Radiometer, A/S Kopenhagen, Typ K 4112) einem hochohmigen Präzisionsmillivoltmeter (Fa. Knick, Berlin, Klasse 0.5) zugeführt. Der "Kurzschlußstrom" aus einer netzbetriebenen, stabilisierten Gleichstromquelle wurde über ein µA-Meter (Fa. Gossen, Klasse 0.5), Silberelektroden, die in 3-molare KCl-Lösung tauchten und zwei "Strombrücken" aus Ringer-Agar, die membranfern mit den Kammerlösungen verbunden waren, dem System zugeleitet. Dabei waren Größe und Richtung dieses Kurzschlußstromes so gewählt, daß die von ihm am Membranwiderstand abfallende Spannung das spontane Membranpotential auf Null kompensierte. Der eingestellte Strom entsprach somit an den untersuchten Membranen dem Ladungsstrom, der vom aktiven Natriumnettotransport aufgebaut wurde, da bei identischen Verhältnissen in beiden Badlösungen sämtliche passiven transepithelialen Nettobewegungen im kurzgeschlossenen Zustand der Membran unterbunden waren.

Beide Ringer-Agar-Brücken bestanden aus PVC-Schlauch mit einer nach Vorschrift (30 ml Frosch-Ringer auf ein Gramm Rein-Agar (Fa. Behring-Werke, Marburg)) hergestellten Füllung von Ringer-Agar. Die lichte Weite der Spannungsbrücken betrug 1.0 mm und ihre Länge 20 cm; die entsprechenden Daten der Strombrücken waren 3.0 mm und 15 cm. Vor dem Beschicken der Kammern wurde die spontane Leerspannung des Meßsystems ohne Membran auf Null kompensiert. Die durch Assymmetrien der Kalomelelektroden entstandenen Polarisationsspannungen betrugen durchschnittlich $\pm$ 3 mV.

Die Versuchskammern zur Bestimmung des transepithelialen Wasserflusses entsprachen modifizierten Ussingkammern /171/. Am Meniskus einer exakt waagerecht liegenden graduierten Pipette, die mit einem Ende in die serosale Badlösung tauchte und deren anderes Ende offen war, konnte die Volu-

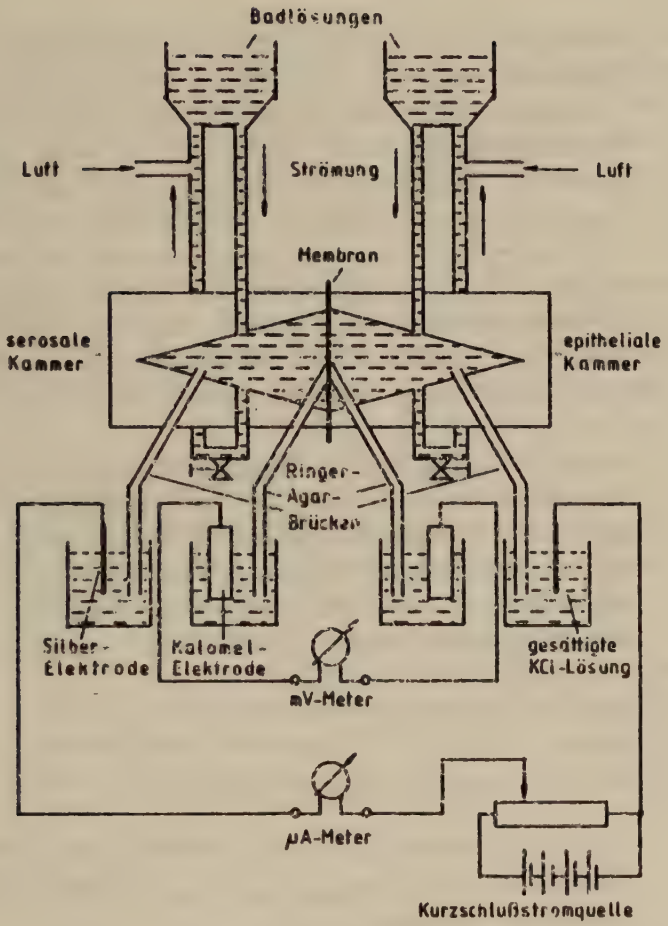


Abb. 4 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung von Potentialdifferenz (PD) und Kurzschlußstrom (KSS) an der isolierten Bauchhaut von Amphibien. Erläuterungen im Text.

menzunahme in der sonst dicht verschlossenen Kammerhälfte abgelesen werden. Zur homogenen Verteilung der zugegebenen Pharmaka diente hier ein plastiküberzogener Magnet, der von einem Magnetrührer in Drehung versetzt wurde. Die epitheliale Kammerhälfte wurde von Luft durchperlt. Störende und das Meßergebnis verfälschende Meniskusschwankungen durch Flottieren der Membran wurden mittels starrer Kunststoffnetze verhindert, die über die Kammeröffnungen gespannt waren und die Membran fest zwischen sich einschlossen. Die Ableitung der elektrischen Größen erfolgte wie bei der bereits beschriebenen Anordnung (vgl. Abb. 4).

Die als "edge-damage" bekannt Erhöhung der Natriumleitfähigkeit der Froschhaut an den eingespannten Rändern mußte bei der bestehenden Versuchsanordnung in Kauf genommen werden. Dieser Effekt war aber für die Versuchsaussage, für die ausschließlich relative Änderungen der elektrischen Membranparameter interpretiert wurden, ohne Bedeutung /187/.

4) Verwendete Lösungen und Substanzen

Die Frosch-Ringer-Lösung hatte stets die folgende Zusammensetzung (Stammlösung):

Na^+	113	mMol/l
K^+	2	mMol/l
Ca^{++}	1	mMol/l
HCO_3^-	2.4	mMol/l
Cl^-	117	mMol/l

Um die Substratabhängigkeit der Prolaktinwirkung zu prüfen, wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen die Membranen während der Nacht vor dem Versuch 12 Stunden lang in Glucose-Ringer-Lösung inkubiert waren. Diese Lösung bestand aus der Stammlösung, der Glucose in einer Konzentration von 5.5×10^{-3} Mol/l zugesetzt wurde.

Zur Ermittlung des Prolaktineinflusses auf die elektrischen Membranparameter wurden Versuche mit Rana temporaria durchgeführt und dabei auf beiden Seiten der Haut unverdünnte Stammlösung als Badlösung verwendet. Die Membranen dieser Tiere eigneten sich jedoch nicht für Messungen des transepithelialen Wasserflusses. Deshalb wurden für diesen Zweck Membranen von Bufo bufo verwendet, deren serosale Badlösung aus unverdünnter Frosch-Ringer-Lösung und deren epitheliale Badlösung aus einer mit destilliertem Wasser auf 10% verdünnten Stammlösung bestand, um einen osmotischen Gradienten aufzubauen. Dieser betrug 200 mOsm/kg H_2O, da die Osmolarität der Frosch-Ringer-Stammlösung 222 mOsm/kg H_2O und die der 1/10 Frosch-Ringer-Lösung 22 mOsm/kg H_2O betrugen (kryoskopische Messung mit Halb-Mikroosmometer der Fa. Knauer).

Die pH-Werte der Lösungen lagen nach Luftdurchperlung zwischen 8.2 und 8.6.

Zur exakten Definition der Versuchsbedingungen wurden die verwendeten Prolaktinpräparationen (Prolaktin-Ferring) auf ihren Prolaktin- und ADH-Anteil radioimmunologisch untersucht. Der Rezeptorassay nach Shiu et al. und v.Werder et al. /157,194/ zur Bestimmung des Prolaktingehaltes der Präparationen wurden im Labor von Herrn Priv. Doz. v. Werder von Herrn Dr. Eversmann durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3. Die Bestimmung der Arginin-Vasopressin und Lysin-Vasopressin Komponenten in den Prolaktinproben

erfolgte durch Herrn Sofroniew im Labor von Herrn Dr. Weindl in der Anatomischen Anstalt der Universität München in einem ADH-RIA nach Robertson et al. und Sofroniew et al. /143,164/. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Daten dieser radioimmunologischen Untersuchungen wurden für die Herstellung anteilsgleicher Prolaktinansätze in den einzelnen Experimenten zugrunde gelegt.

Wegen der leichten Verfügbarkeit und des - wie sich zeigte - für meßbare ADH-Effekte in Experimenten mit der "Ussingkammer" zu geringen Verunreinigungsgrades an ADH (s. radioimmunologische Bestimmungen, Tab. 3), wurde für alle Versuche "Prolaktin Ferring", Ferring GmbH, Kiel, verwendet und die Präparation nach Vorschrift des Herstellers mit dem beigefügtem Lösungsmittel durchgeführt. Nach Feststellung einer grundsätzlichen Wirkung des Prolaktin dienten weitere Versuchsserien dann dem differenzierten Nachweis der registrierten Änderungen der elektrischen Membranparameter als Prolaktineffekte.

Das Lösungsmittel für Prolaktin-Ferring hatte folgende Zusammensetzung

Phenolum		15 mg
Sacch. amyl.		q.s.
Aqua pro inj.	ad	5 ml

und zeigte in den radioimmunologischen Bestimmungen keinerlei Aktivität. Die Phenoldosierung berechnete sich zu 7.5 µg/ml Badlösung.

Membranen, die in Kontrollversuchen reines Lösungsmittel erhielten, unterschieden sich nicht von Membranen, die zu

Kontrollzwecken ohne jegliche Zugabe blieben: in beiden Fällen wurde über Stunden Spannungs- und Stromkonstanz auf dem 100% Niveau gemessen (s.S. 30).

Wie bereits oben begründet, wurde zur endgültigen Sicherung der mit "Prolaktin-Ferring" erhaltenen Versuchsergebnisse als prolaktinspezifische Membraneffekte einige Versuchsserien mit dem internationalen Prolaktinstandard NIH-P-S 12 durchgeführt, der nur extrem geringe ADH-Kontamination aufwies (s. Tab. 3). Der Prolaktingehalt dieses Präparates wurde nach der Beziehung

1 ng Prolaktinpulver ≙ 35 µE Prolaktin

und der ADH-Gehalt nach Vorherr /181/ berechnet, da die zu Versuchszwecken zur Verfügung stehende Menge für zusätzliche radioimmunologische Bestimmungen nicht ausreichte.

Das Antidiuretische Hormon (ADH, Pitressin, Parke-Davis, München) bestand aus 50% Arginin-Vasopressin und aus 50% Lysin-Vasopressin und wurde jeweils am Versuchsende in der supramaximalen Dosis von 100 mE/ml Badlösung auf der serosalen Seite zugegeben, in einigen Versuchen aber auch zu Beginn des Experimentes.

Alle Präparationen wurden vor Versuchsbeginn auf die Zugabekonzentration verdünnt.

5) Versuchsprotokoll

Nach Einspannen der Häute und Füllen der Kammern erreichten die Membranen nach ein bis zwei Stunden Strom- und

Spannungskonstanz. Äquilibrierungskriterium waren zwei im Abstand von 15 Minuten gemessene identische Werte von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom. Als Ausgangswert für die Wasserflußmessungen wurde die Summe der in einer Stunde bei 15 minütiger Ablesefolge angefallenen absoluten Volumenzunahmen in der Pipette verwendet. Unmittelbar nach Feststellung des Gleichgewichtes wurden die Pharmaka ausschließlich auf der serosalen Seite zugegeben, da aus Vorversuchen bekannt war, daß Zugabe auf der mukosalen Seite keine Membranreaktion bewirkte (s.a. /199/).
Die dabei verwendeten Dosen lagen sowohl bei ADH als auch bei Prolaktin weit über den an lebenden Tieren gemessenen, physiologischen Konzentrationen. Dies erwies sich als notwendig, um mit der gegebenen Versuchsanordnung an den verwendeten Membranen die prinzipielle Wirksamkeit des Prolaktin zu untersuchen.

Alle weiteren Ablesungen erfolgten in Abständen von jeweils 15 Minuten. Strom und Spannung wurden als Prozentwerte der jeweiligen Äquilibrierungsgröße, definiert als 100%, nach folgender Formel ausgedrückt:

$$P_x = \frac{t_x}{t_o} \times 100$$

(P_x Prozentwert zum Zeitpunkt x
t_x Absolutwert zum Zeitpunkt x
t_o Absolutwert zum Zeitpunkt 0, gleich Äquilibrierungswert)

Mit diesem Verfahren wurden im Hinblick auf die Schwankungen des spontanen Membranpotentials und des Kurzschlußstromes die Ausgangswerte normiert. Um jedoch zu große relative Änderungen bei geringen Ausgangswerten zu vermeiden, wurden nur Versuche mit Spannungen von wenigstens 25 mV und Strömen von mindestens 60 µA/3.14 cm² ausgewertet,

wenn darüber hinaus das numerische Verhältnis von Strom zu Spannung wenigstens 1.7 betrug.

Die Wasserflußraten wurden demgegenüber in Absolutwerten dargestellt, die sich aus jeweils vier in zeitlichen Abständen von je 15 Minuten erhaltenen Werten zusammensetzten. Nach jeder Zugabe eines Pharmakons wurde die Pipette gewechselt und nach weiteren fünf Minuten der Meniskus als neuer Bezugspunkt registriert. Am Ende des Versuches erfolgte die pH-Messung der serosalen und epithelialen Badlösungen.

Die Signifikanzen wurden in üblicher Weise nach dem t-Test berechnet.

IV, ERGEBNISSE

Die Kurvenverläufe der graphischen Darstellungen des folgenden Kapitels beziehen sich nicht auf die absoluten Strom- und Spannungswerte, sondern drücken relative, auf die am Ende der Aquilibrierungsperioden erhaltenen Gleichgewichtswerte bezogene Änderungen von PD und KSS aus. Diese Gleichgewichtswerte sind in Tabelle 2 dargestellt. Sie waren zum Zeitpunkt Null in den einzelnen, vergleichend ausgewerteten experimentellen Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden.

A) Radioimmunologische Bestimmungen

1) Prolaktin

Im Rezeptorassay nach Shiu et al. /157/ und v. Werder et al. /194/ ergaben sich die in der Tabelle 3 dargestellten Werte für die vier untersuchten Proben von "Prolaktin-Ferring". Die von der Firma angegebene Menge betrug 200 mE/ml. Der Prolaktingehalt des NIH-P-S 12 - Präparates wurde nach der Beziehung auf Seite 29 berechnet.

2) ADH

Die radioimmunologische Bestimmung der Arginin- und Lysin-Vasopressinkomponente in den Prolaktinpräparationen nach Robertson et al. /143/ und Sofroniew et al. /164/ ergab die Werte der Tabelle 3. Der ADH-Anteil im NIH-P-S 12 Prä-

	PD (mV) MW ± SEM	KSS (µA/3.14 cm²) MW ± SEM	n	Abb. bzw. Tabelle
1)	48.1 ± 7.1	117.9 ± 13.5	10	5a - Tab. 4
2)	42.9 ± 2.4	137.0 ± 10.7	10	5b - Tab. 4
3)	40.2 ± 1.8	104.9 ± 9.2	13	5c
4)	47.9 ± 5.3	111.2 ± 13.6	10	5d - Tab. 4
5)	41.9 ± 2.7	93.2 ± 8.9	10	6e - Tab. 4
6)	46.1 ± 4.9	113.5 ± 10.9	18	6f
7)	58.1 ± 7.1	123.8 ± 15.3	10	6g
8)	57.9 ± 6.7	82.6 ± 7.4	7	6h
9)	36.0 ± 2.8	122.4 ± 10.4	9	7i
10)	54.5 ± 4.1	110.8 ± 10.4	11	7j
11)	39.1 ± 6.2	122.4 ± 5.6	9	8k
12)	46.8 ± 5.5	95.6 ± 9.4	9	8l
13)	50.8 ± 3.8	131.7 ± 7.5	9	8m
14)	49.6 ± 6.0	132.2 ± 16.4	9	8n
15)	44.8 ± 4.0	116.4 ± 3.6	12	9s
16)	42.3 ± 2.1	130.7 ± 11.4	14	9t
17)	44.7 ± 7.9	140.9 ± 17.1	7	9d´
18)	56.8 ± 14.7	124.7 ± 7.2	6	9i´
19)	31.7 ± 2.3	113.7 ± 11.3	9	Tab. 5r
20)	50.7 ± 8.2	176.0 ± 22.2	6	Tab. 5q
21)	42.1 ± 4.8	169.9 ± 11.1	7	Tab. 5p
22)	34.2 ± 4.2	139.4 ± 11.0	7	Tab. 5o
23)	40.2 ± 1.8	131.3 ± 7.9	17	Tab. 6b´
24)	34.4 ± 4.2	81.1 ± 6.3	8	Tab. 6b´´
25)	42.6 ± 1.8	90.4 ± 5.2	21	Tab. 6e´
26)	40.7 ± 6.2	90.0 ± 7.0	7	Tab. 6e´´

Tabelle 2 Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte der absoluten Spannungen und Ströme zum Zeitpunkt der Zugabe (Zeitpunkt der Äquilibrierung). Die diese Mittelwerte bildenden Einzelwerte wurden jeweils als 100%-Werte definiert und die folgenden Werte als Prozentangabe zu diesem Wert ausgedrückt (s.S. 30).

parat wurde von Vorherr /181/ übernommen.

Aus diesen Ergebnissen wurden die aktuellen, im Experiment auftretenden Verunreinigungsdosen berechnet und die Prolaktineinwaagen so bestimmt, daß für jedes Experiment die gleiche Dosis Prolaktin, unabhängig vom Gehalt der vom Hersteller gelieferten Prolaktinpräparationen, pipettiert werden konnte.

B) Prolaktinwirkungen an der Froschhaut

1) Nachweis der Prolaktinwirkung, Abb. 5 und Tab. 4

Zur Ermittlung eines Prolaktineffektes wurden zunächst zwei verschiedene Dosen Prolaktin-Ferring zur serosalen Seite der eingespannten Bauchhaut von Rana temporaria gegeben und die Wirkung mit der einer geringen Dosis ADH und beide mit Kontrollexperimenten ohne Zugabe verglichen.

In allen durchgeführten Untersuchungen stellte sich heraus, daß qualitative Unterschiede im Verhalten von Potentialdifferenz (PD) und Kurzschlußstrom (KSS) vorwiegend auf das Zeitintervall der ersten 45 Minuten nach Zugabe der Testsubstanzen beschränkt blieben.

a) Änderungen der Potentialdifferenz

Nach Zugabe einer Prolaktindosis von 390 mE/ml Badlösung stieg die PD gegenüber der Kontrolle nach 15 min signifikant ($P < .0125$), 30 und 45 min später hochsignifikant

	"Prolaktin-Ferring"				
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	NIH-P-S 12
Prolaktingehalt der Präparation (E/ml Prolaktinlösung)	80	31	31	31	42
ADH-Gehalt der Präparation (mE/ml Prolaktinlösung)	10	25	25	20	1.6 ± 1 (mE/mg)
ADH-Gehalt, bezogen auf den Prolaktingehalt (10^{-5} E ADH/E Prolaktin)	12.5	80.6	80.6	54.5	4.6
ADH-Gehalt pro ml Badlösung (µE/ml Badlösung)	10 bei Zugabe von 80 mE/ml 50 bei Zugabe von 390 mE/ml	Zugabe von jeweils 80 mE/ml Badlösung 64	64	51	3.6

Tabelle 3 *Ergebnisse der radioimmunologischen Untersuchungen der Prolaktinpräparationen auf Prolaktin und ADH (s.S. 27f.). Werte von NIH-P-S 12 nach /181/.*

($P < .0005$) an (Abb. 5a, 5d). Im Vergleich mit einer niedrigen Dosis ADH (1 mE/ml Badlösung) ergab sich nach 15 min noch kein Unterschied in der Höhe der PD, aber nach 30 und 45 min lag die durch Prolaktin induzierte Zunahme der PD signifikant ($P < .01$) über der durch ADH stimulierten (Abb. 5a, 5c), die ihrerseits in den ersten drei Ableseperioden signifikant über der der Kontrollexperimente lag ($P < .025$; Abb. 5c, 5d).

Der ADH-Anteil der dabei zugegebenen Prolaktinpräparationen betrug hier weniger als 50 µE/ml Badlösung (s. Tab. 3), was 5% der zum Vergleich zugefügten Dosis von 1 mE ADH pro ml Badlösung entsprach.

Zugabe einer geringeren Prolaktindosis (80 mE/ml Badlösung) führte dagegen zu einem signifikanten Abfall der PD gegenüber der Kontrolle und den Experimenten mit ADH (1 mE/ml) zum Zeitpunkt der ersten Ablesung (t = 15 min). Im Verlauf der ersten Stunde ergaben sich sonst keine weiteren signifikanten Unterschiede. Der ADH-Anteil in diesen Prolaktinpräparationen betrug 10 µE/ml Badlösung (s. Tab. 3; Abb. 5b, 5c, 5d).

Abb. 5 (nächste Seite) Einfluß zweier verschiedener Dosen Prolaktin-Ferring auf Membranpotential und Kurzschlußstrom der Bauchhaut von Rana temporaria. Die Zugabe erfolgte auf der serosalen Seite. Darstellung der prozentualen Änderungen der zum Zeitpunkt Null unmittelbar vor Zugabe ermittelten absoluten Werte (vgl. Tab. 2).
a) Prolaktin, 390 mE/ml Badlösung; b) Prolaktin, 80 mE/ml Badlösung; c) Kontrolle: ADH, 1 mE/ml Badlösung; d) Kontrolle: keine Zugabe. Versuchszeit: Dezember 1978 - Januar 1979

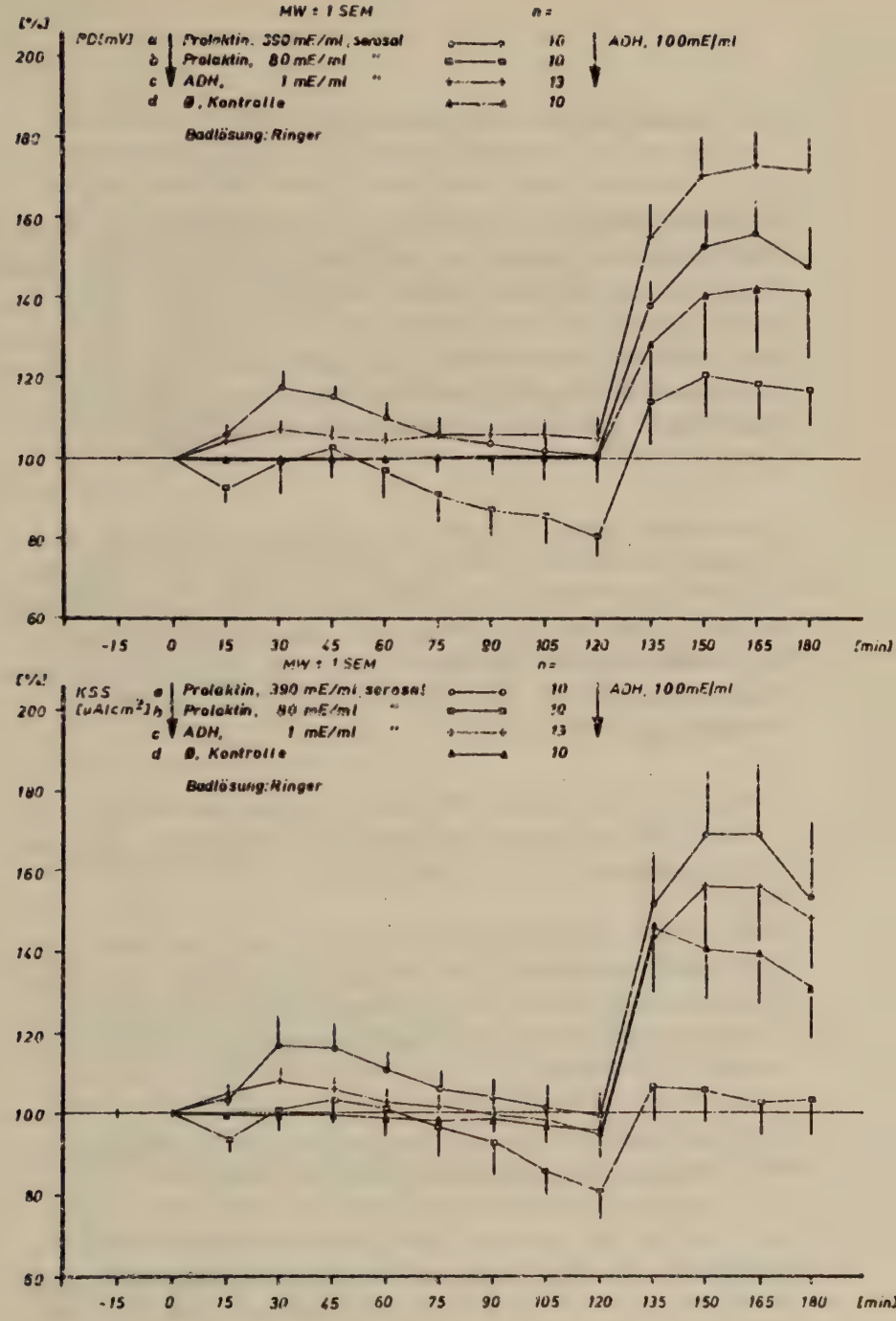

MW ± 1 SEM
n=
[%]
PD[mV]
a Prolaktin, 350 mE/ml, serosal 10
b Prolaktin, 80 mE/ml " 10
c ADH, 1 mE/ml " 13
d Ø, Kontrolle 10
ADH, 100mE/ml
Badlösung: Ringer
200
180
160
140
120
100
80
60
-15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 [min]
MW ± 1 SEM
n=
[%]
KSS [uAlcm²]
a Prolaktin, 390 mE/ml, serosal 10
b Prolaktin, 80 mE/ml " 10
c ADH, 1 mE/ml " 13
d Ø, Kontrolle 10
ADH, 100mE/ml
Badlösung: Ringer
200
180
160
140
120
100
80
60
-15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 [min]

Abb. 5

b) Änderungen des Kurzschlußstromes

Die KSS-Kurve stieg nach Zugabe von Prolaktin (390 mE/ml Badlösung) verzögert an, erreichte zwischen 30 und 45 min ein Plateau und fiel anschließend fast linear wieder zum Ausgangswert ab. 15, 30 und 45 min nach Zugabe unterschieden sich die Kurzschlußströme zwar signifikant ($P < .025$) von den Kontrollen, nicht aber im Vergleich zu den mit niedriger ADH-Dosis inkubierten Membranen (Abb. 5a, 5c, 5d).

Die Zugabe der geringeren Prolaktindosis (80 mE/ml Badlösung) bewirkte gegenüber den Kontrollen zum Zeitpunkt $t = 15$ min einen mit $P < .05$ signifikanten, gegenüber den Experimenten mit ADH (1 mE/ml) einen hochsignifikanten ($P < .0025$) Abfall des KSS, während der prolaktininduzierte Anstieg 45 min nach Zugabe statistisch unauffällig blieb (Abb. 5b, 5c, 5d).

Der von der geringen ADH-Dosis (1 mE/ml Badlösung) stimulierte KSS lag in den ersten 45 min signifikant über dem Kontrollniveau ($P < .05$; Abb. 5c, 5d).

Bei beiden Prolaktindosierungen fiel auf, daß sowohl Potentialdifferenz als auch Kurzschlußstrom den steilsten Anstieg erst in der Zeit zwischen 15 min und 30 min nach Zugabe zeigten und die Kurven nahezu parallel verliefen.

2) Einfluß einer 12-stündigen Inkubation der Membranen in Glucose-Ringer-Lösung, Tab. 4, Abb. 6

Obgleich sich nach Gabe von Prolaktin-Ferring (390 mE/ml

Badlösung) Membranpotential und Kurzschlußstrom in charakteristischer Weise und stärker änderten als bei Applikation einer ADH-Dosis, die 20 mal höher als die berechneten ADH-Beimengungen war, zeigten die Membranen auf eine Prolaktindosis von 80 mE/ml Badlösung nur geringe Stimulation, deren Maximum zur Zeit t = 45 min erreicht wurde und deren relative Höhe, bezogen auf das Minimum des initialen Abfalles 15 min nach Zugabe, nur 10% betrug. Daher wurden die Versuche unter Bedingungen wiederholt, die - etwa in Analogie zur Wirkung des Aldosteron - möglicherweise zu einer stärkeren Reaktion auf Prolaktin führen würden.

Zu diesem Zweck wurden die Membranen 12 Stunden lang in einer Ringer-Lösung inkubiert, die Glucose in einer Konzentration von 5.5×10^{-3} Mol/l enthielt, um den Zellen mehr Substrat für den aktiven Transport anzubieten (s.a. /46/). Die nachfolgende Prolaktininkubation bewirkte jedoch einen prinzipiell gleichartigen Verlauf wie bei nicht vorinkubierten Membranen.

a) Änderungen der Potentialdifferenz

Der initiale PD-Abfall 15 min nach Zugabe von Prolaktin (80 mE/ml Badlösung) war bei Membranen, die 12 Stunden in Glucose-Ringer inkubiert waren, gegenüber den Kontrollmembranen signifikant ($P < .05$); und der darauf folgende Anstieg überschritt nach 45 min ebenfalls signifikant das Kontrollniveau ($P < .025$; Tab. 4). Gegenüber den nicht in Glucose-Ringer inkubierten Membranen war die prolaktinstimulierte Potentialdifferenz zwar merklich angestiegen, die Unterschiede zeigten aber innerhalb der ersten Stunde des Experimentes statistisch (noch) keine Signifikanz ($P > .05$; Tab. 4; Abb. 6).

Minuten nach Zugabe		0	15	30	45	60
Kontrolle, keine Zugabe	PD	100.0	99.9 ± 0.6	99.5 ± 1.0	99.9 ± 1.5	100.4 ± 1.7
n = 10	KSS	100.0	99.6 ± 1.3	99.1 ± 1.9	99.0 ± 2.2	98.5 ± 2.6
Prolaktin-Ferring, 80 mE/ml	PD	100.0	93.2 ± 2.8	99.3 ± 6.6	102.7 ± 7.0	97.1 ± 6.1
n = 10	KSS	100.0	93.3 ± 2.4	100.7 ± 4.5	102.9 ± 6.0	101.8 ± 6.8
Prolaktin-Ferring, 390 mE/ml	PD	100.0	106.3 ± 2.5	118.2 ± 3.8	115.6 ± 2.6	110.3 ± 3.1
n = 10	KSS	100.0	103.8 ± 1.3	116.8 ± 7.7	116.1 ± 6.5	110.8 ± 4.6
Prolaktin-Ferring, 80 mE/ml,	PD	100.0	94.9 ± 2.4	103.5 ± 7.4	118.7 ± 8.0	116.3 ± 9.5
n = 10	KSS	100.0	102.4 ± 1.8	129.6 ± 9.9	149.0 ±12.9	150.6 ±12.0
Membranen 12 Stunden in Glucose-Ringer inkubiert						

Tabelle 4 Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte von drei Prolaktinexperimenten und einer Kontrolle jeweils 15, 30, 45 und 60 Minuten nach Zugabe. Die absoluten PD- und KSS-Werte zum Zeitpunkt Null wurden willkürlich gleich 100.0 gesetzt; die in der Tabelle aufgeführten Daten sind die hierzu prozentualen zeitlichen Änderungen (vgl. Tab. 2; s.S. 30).

b) Änderungen des Kurzschlußstromes

Hier schien die 12-stündige Inkubation in Glucose-Ringer die Wirkung des Prolaktin auf den KSS stark zu fördern. Mit der offenbar typischen Verzögerung während der ersten 15 min fanden sich KSS-Zunahmen, die die Kontrollen zu den Zeiten t = 30 min ($P < .005$) und t = 45 min ($P < .0025$) hochsignifikant übertrafen. Auch gegenüber der prolaktininduzierten Stimulierung des Kurzschlußstromes bei nicht glucoseinkubierten Membranen unterschied sich die Höhe des KSS mit $P < .01$ nach 30 min und $P < .0025$ nach 45 und 60 min hochsignifikant (Tab. 4; Abb. 6).

3) Einfluß der Vorinkubation ohne Glucose und des Glucosezusatzes bei der Ausführung des Prolaktinexperimentes, Abb. 6

Der das Stromniveau nichtinkubierter Membranen deutlich übertreffende Anstieg des Kurzschlußstromes glucoseinkubierter Membranen führte zu der Frage, ob das Energiesubstrat Glucose oder allein die Vorinkubation für den beobachteten Effekt ausschlaggebend war. Deshalb wurden in einer weiteren Versuchsserie Membranen 12 Stunden in normaler Ringerlösung ohne Glucosezusatz inkubiert (Abb. 6g). Darüberhinaus wurden Prolaktinexperimente in Glucose-Ringer statt in normaler Frosch-Ringer-Lösung durchgeführt. Dabei entsprach die Zeit bis zur Einstellung der Gleichgewichtswerte der Membranen praktisch einer einstündigen Vorinkubation in Glucose-Ringer und die Prolaktinzugabe erfolgte dann in die glucosehaltige Badlösung (Abb. 6f). Als spezielle Kontrolle wurden auch Membranen 12 Stunden in Glucose-Ringer inkubiert, die im anschließenden Experiment kein Prolaktin erhielten (Abb. 6h)

a) Änderungen der Potentialdifferenz

Wurde als Badlösung statt normaler Frosch-Ringer-Lösung Glucose-Ringer-Lösung verwendet, die Membran aber nicht 12 Stunden vorinkubiert, erwies sich gegenüber der Kontrolle ohne Zugabe nur der initiale Abfall der Potentialdifferenz nach Gabe von Prolaktin (80 mE/ml Badlösung) als hochsignifikant verschieden ($P < .0005$; Abb. 6f, 5d), nicht jedoch der nachfolgende Anstieg. Ebensowenig bestanden statistische Unterschiede zu allen in Frosch-Ringer-Lösung ausgeführten Prolaktinexperimenten (80 mE/ml Badlösung) ohne Vorinkubation oder nach vorheriger 12-stündiger Glucose-Ringer- bzw. Frosch-Ringer-Inkubation (Abb. 6f, 6e, 6g, 5b).

Nach 12-stündiger Inkubation in Glucose-Ringer-Lösung ohne Zugabe bewegten sich die Membranpotentiale knapp unter dem 100%-Niveau und unterschieden sich statistisch nicht von den nichtinkubierten Kontrollexperimenten (Abb. 6h, 5d).

b) Änderungen des Kurzschlußstromes

Ähnlich den Potentialdifferenzen zeigte sich auch beim

Abb. 6 (nächste Seite) Einfluß 12-stündiger Inkubation in Glucose-Ringer (5.5×10^{-3}M) auf die Wirkung von Prolaktin-Ferring an der isolierten Bauchhaut von Rana temporaria. Zugabe auf der serosalen Seite. Prozentuale Änderungen der zum Zeitpunkt Null unmittelbar vor Zugabe ermittelten absoluten Strom- und Spannungswerte (vgl. Tab. 2). e) Prolaktin, 80 mE/ml Badlösung, Vorinkubation in Glucose-Ringer; f) Prolaktin, 80 mE/ml Badlösung, Badlösung Glucose-Ringer; g) Prolaktin, 80 mE/ml Badlösung, Vorinkubation in Frosch-Ringer; h) Kontrolle: keine Zugabe, Vorinkubation in Glucose-Ringer. Versuchszeit: Dezember 1978 - Januar 1979

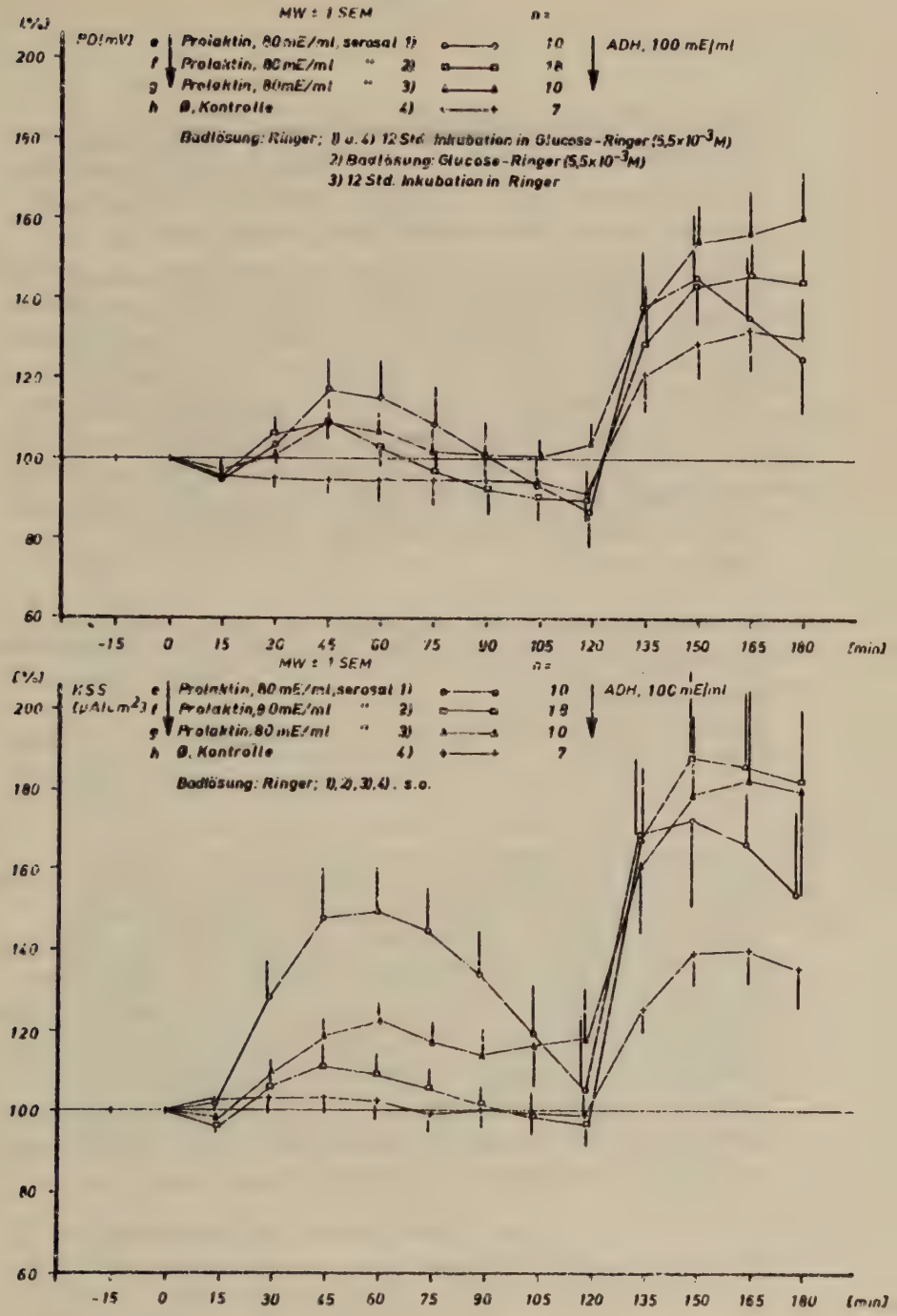

MW ± 1 SEM
n =
(%)
PD(mV)
e Prolaktin, 80 mE/ml, serosal 1) 10
f Prolaktin, 80 mE/ml " 2) 18
g Prolaktin, 80 mE/ml " 3) 10
h Ø, Kontrolle 4) 7
ADH, 100 mE/ml
Badlösung: Ringer; 1) u. 4) 12 Std. Inkubation in Glucose-Ringer (5,5x10⁻³M)
2) Badlösung: Glucose-Ringer (5,5x10⁻³M)
3) 12 Std. Inkubation in Ringer
200
180
160
140
120
100
80
60
-15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 (min)
MW ± 1 SEM
n =
(%)
KSS (µAlcm⁻²)
e Prolaktin, 80 mE/ml, serosal 1) 10
f Prolaktin, 80 mE/ml " 2) 18
g Prolaktin, 80 mE/ml " 3) 10
h Ø, Kontrolle 4) 7
ADH, 100 mE/ml
Badlösung: Ringer; 1), 2), 3), 4). s.o.
200
180
160
140
120
100
80
60
-15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 (min)

Abb. 6

Vergleich der Kurzschlußströme, daß bei Ausführung des Experimentes in Glucose-Ringer-Lösung (Abb. 6f) nur der initiale Abfall bei t = 15 min gegenüber den nichtinkubierten Kontrollexperimenten ohne Zusatz (Abb. 5d) mit $P < .025$ statistisch signifikant unterschieden war und sich keine statistisch verifizierbaren Unterschiede gegenüber den KSS-Werten der Experimente in normaler Ringerlösung ergaben (Abb. 5b). Auch war die Stimulation des KSS hier signifikant geringer ($P < .005$) als in den Versuchen mit 12-stündiger Glucose-Ringer-Inkubation der Membranen (Abb. 6e) Bei alleiniger Inkubation der Membranen in Glucose-Ringer ohne Zugabe von Prolaktin unterschied sich der KSS nicht von der Kontrolle ohne Inkubation und ohne Zugabe (Abb. 6h, 5d).

Die alleinige Inkubation in Frosch-Ringer ohne Glucose-Zusatz führte jedoch ebenfalls zu einer erhöhten Stimulation des Kurzschlußstromes durch Prolaktin (Abb. 6g), die den prolaktininduzierten KSS-Anstieg nichtinkubierter Membranen zur Zeit t = 45 min mit $P < .025$ signifikant übertraf (Abb. 5b).

In Abb. 6 sind deutlich die Einflüsse der unterschiedlichen Vorbehandlungen der Membranen auf die Wirkung des Prolaktin zu erkennen: die stärkste Stimulation des KSS bewirkte Prolaktin nach 12-stündiger Inkubation der Membranen in Glucose-Ringer (Abb. 6e), etwas geringere KSS-Werte wurden bei Verabreichung des Prolaktin nach 12-stündiger Inkubation der Membranen in normaler Ringerlösung erhalten (Abb. 6g) und auch Experimente in Glucose-Ringer ohne Voinkubation führten nach Prolaktingabe zu höheren KSS-Werten als die Ausführung in normaler Ringerlösung (Abb. 6f, 5b).

4) Einfluß der Glucoseinkubation auf die ADH-Wirkung; Prolaktin- und ADH-Effekte bei ADH-vorstimulierten Membranen, Abb. 7, Abb. 8

Zusammenfassend ergibt sich aus den bisherigen Versuchen ein charakteristischer Einfluß des Prolaktin an der isolierten Bauchhaut von Rana temporaria, der nach initialer Erniedrigung und anschließender Stimulierung als biphasischer Potentialverlauf und als ein nach ca. 30 minütigem Intervall eintretender Anstieg des Kurzschlußstromes imponiert, wobei die Kurzschlußstromwirkung nach vorausgegangener mehrstündiger Inkubation der Membranen in Glucose-Ringer deutlich zunahm.

Im Hinblick auf die grundsätzliche Frage nach dem Einfluß von ADH-Beimengungen in den verwendeten Prolaktinpräparationen schien es daher auch hier angezeigt, zu überprüfen, ob die Vorinkubation in Glucose-Ringer nicht auch die Wirkung des ADH und damit die Effekte einer ADH-"Verunreinigung" an der Froschhaut fördert. Deshalb wurden sowohl 12 Stunden in Glucose-Ringer inkubierte als auch nicht inkubierte Membranen mit einer supramaximalen Dosis ADH (100 mE/ml Badlösung) auf der serosalen Seite behandelt; zwei Stunden später erfolgte dann die Zugabe von Prolaktin-Ferring, um zu ermitteln, ob bei abgesättigten ADH-Bindungsstellen das Prolaktin eine den früher durchgeführten Versuchen entsprechende ähnliche Wirkung zeigte (Abb. 7). Zu Kontrollzwecken wurde nach zwei Stunden anstelle von Prolaktin auch ADH in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 mE/ml und 100 mE/ml Badlösung) zugesetzt (Abb. 8).

a) Änderungen der Potentialdifferenz

Vorausgehende 12-stündige Inkubation der Membranen in Glu-

cose-Ringer-Lösung beeinflußte weder die absolute Höhe (s. Tab. 2) noch das Ausmaß der durch Gabe hoher ADH-Mengen (100 mE/ml Badlösung) erzielbaren relativen Potentialanstiege.

Im Gegensatz zu den verzögert eingetretenen stimulatorischen Wirkungen des Prolaktin (Abb. 5, Abb. 6, Tab. 4) setzte die ADH-induzierte Stimulation der PD hier sofort ein und erreichte innerhalb der ersten Viertelstunde den maximalen Zuwachs (Abb. 7, Abb. 8).

Zur Prüfung der Prolaktinwirkung an bereits ADH-vorstimulierten Membranen wurden die Potentialwerte innerhalb einer Serie vor und nach der Prolaktinzugabe miteinander verglichen. Der Abfall der Potentialdifferenz 15 min nach Zugabe von Prolaktin war bei nicht inkubierten Membranen im Vergleich zum Spannungswert vor der Zugabe signifikant ($P < .025$), der 30 min danach folgende Wiederanstieg erwies sich dagegen im Vergleich mit dem unmittelbar vorhergehenden Potentialwert als nicht signifikant ($P > .05$; Abb. 7i). Nach vorausgegangener Inkubation in Glucose-Ringer zeigte sich ein ähnlicher Verhalten nur als geringfügig ausgeprägter Trend (Abb. 7j).

Erhielten die ADH-vorstimulierten Membranen statt Prolaktin (80 mE/ml Badlösung) erneut ADH in den Dosierungen 10 mE/ml bzw. 100 mE/ml Badlösung, so war in keinem dieser Fälle weder bei Glucose-inkubierten noch bei nicht inkubierten Membranen eine Stimulation über das bis zum Zeitpunkt dieser zweiten ADH-Zugabe erreichte Niveau hinaus zu beobachten (Abb. 8).

b) Änderungen des Kurzschlußstromes

Deutlich fiel bei der auch hier unmittelbar nach Zugabe einsetzenden Stimulierung des Kurzschlußstromes durch ADH (100 mE/ml Badlösung) der Einfluß einer 12-stündigen Vorinkubation der Membranen in Glucose-Ringer aus: die Stimulation des KSS hielt über längere Zeit an (Abb. 7, Abb. 8).

Zugabe von Prolaktin (80 mE/ml Badlösung) zu solcherart ADH-vorstimulierten Membranen führte nach 30 min bei inkubierten und nicht inkubierten Membranen zu einem erneuten leichten Wiederanstieg des inzwischen abgefallenen Kurzschlußstromes (Abb. 7), während Zugabe von ADH in keiner der beiden Dosierungen (10 mE/ml und 100 mE/ml Badlösung), weder bei inkubierten noch bei nicht inkubierten Membranen, eine sichtbare Änderung der Stromverläufe bewirkte (Abb. 8).

Abb. 7 (nächste Seite) und Abb. 8 (übernächste Seite) Einfluß der ADH-Vorstimulation auf die Wirkung von Prolaktin-Ferring an der isolierten Bauchhaut von Rana temporaria. Zugabe auf der serosalen Seite. Prosentuale Änderungen der zum Zeitpunkt Null unmittelbar vor Zugabe ermittelten absoluten Strom- und Spannungswerte (vgl. Tab. 2).
i) Prolaktin, 80 mE/ml Badlösung, Vorstimulation mit ADH, 100 mE/ml Badlösung; j) Prolaktin, 80 mE/ml Badlösung, Vorstimulation mit ADH, 100 mE/ml Badlösung, Vorinkubation in Glucose-Ringer;
k) ADH, 10 mE/ml Badlösung, Vorstimulation mit ADH, 100 mE/ml Badlösung; l) ADH, 10 mE/ml Badlösung, Vorstimulation mit ADH, 100 mE/ml Badlösung, Vorinkubation in Glucose-Ringer; m) ADH, 100 mE/ml Badlösung, Vorstimulation mit ADH, 100 mE/ml Badlösung, Vorinkubation in Glucose-Ringer;
n) ADH, 100 mE/ml, Vorstimulation mit ADH, 100 mE/ml. Versuchszeit: Februar 1979 - März 1979

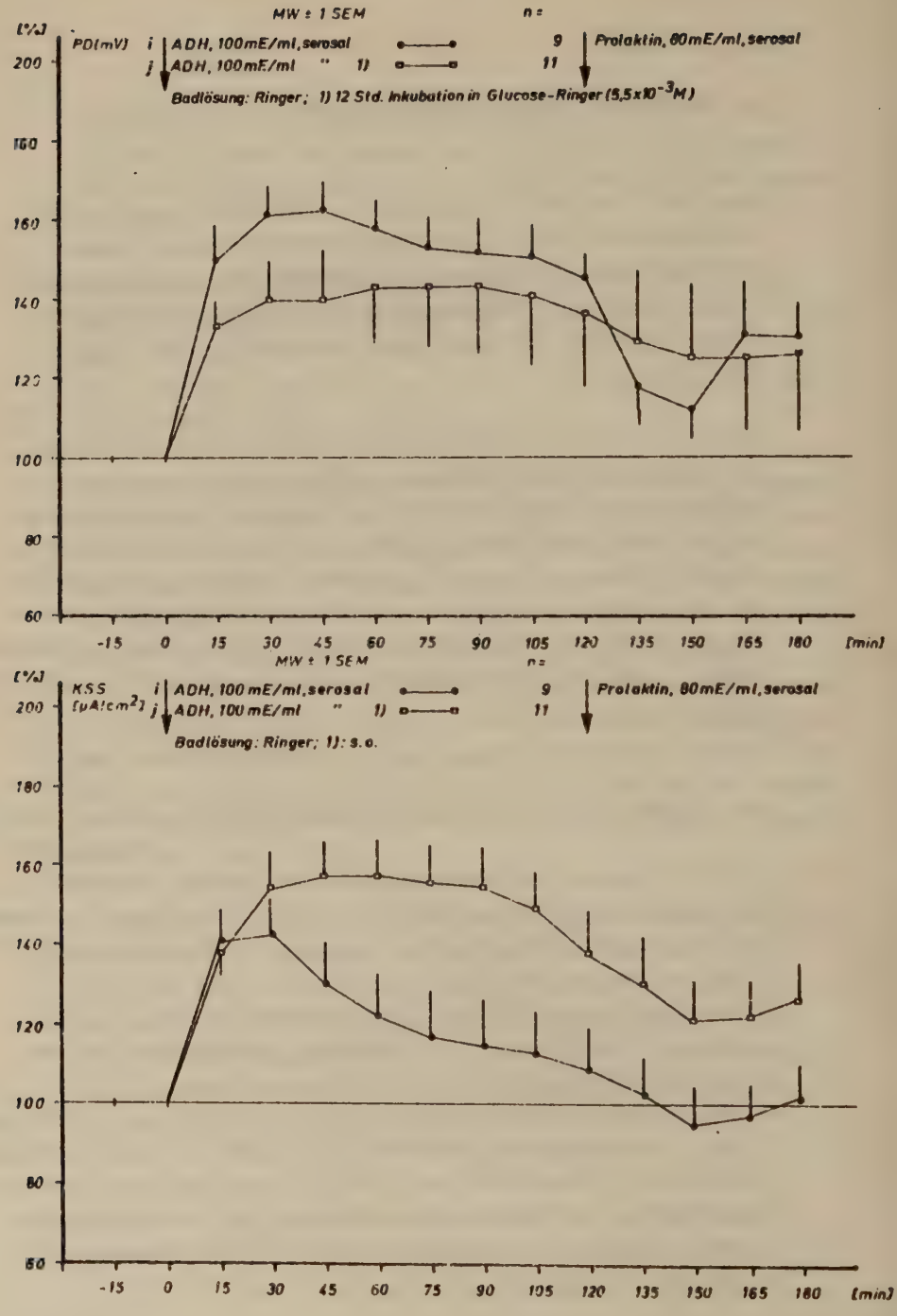

MW ± 1 SEM
n =
[%]
PD(mV) i ADH, 100mE/ml, serosal 9 Prolaktin, 80mE/ml, serosal
j ADH, 100mE/ml " 1) 11
Badlösung: Ringer; 1) 12 Std. Inkubation in Glucose-Ringer (5,5x10⁻³M)
200
180
160
140
120
100
80
60
-15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 [min]
MW ± 1 SEM
n =
[%]
KSS i ADH, 100 mE/ml, serosal 9 Prolaktin, 80mE/ml, serosal
[µA/cm²] j ADH, 100 mE/ml " 1) 11
Badlösung: Ringer; 1): s.o.
200
180
160
140
120
100
80
60
-15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 [min]

Abb. 7

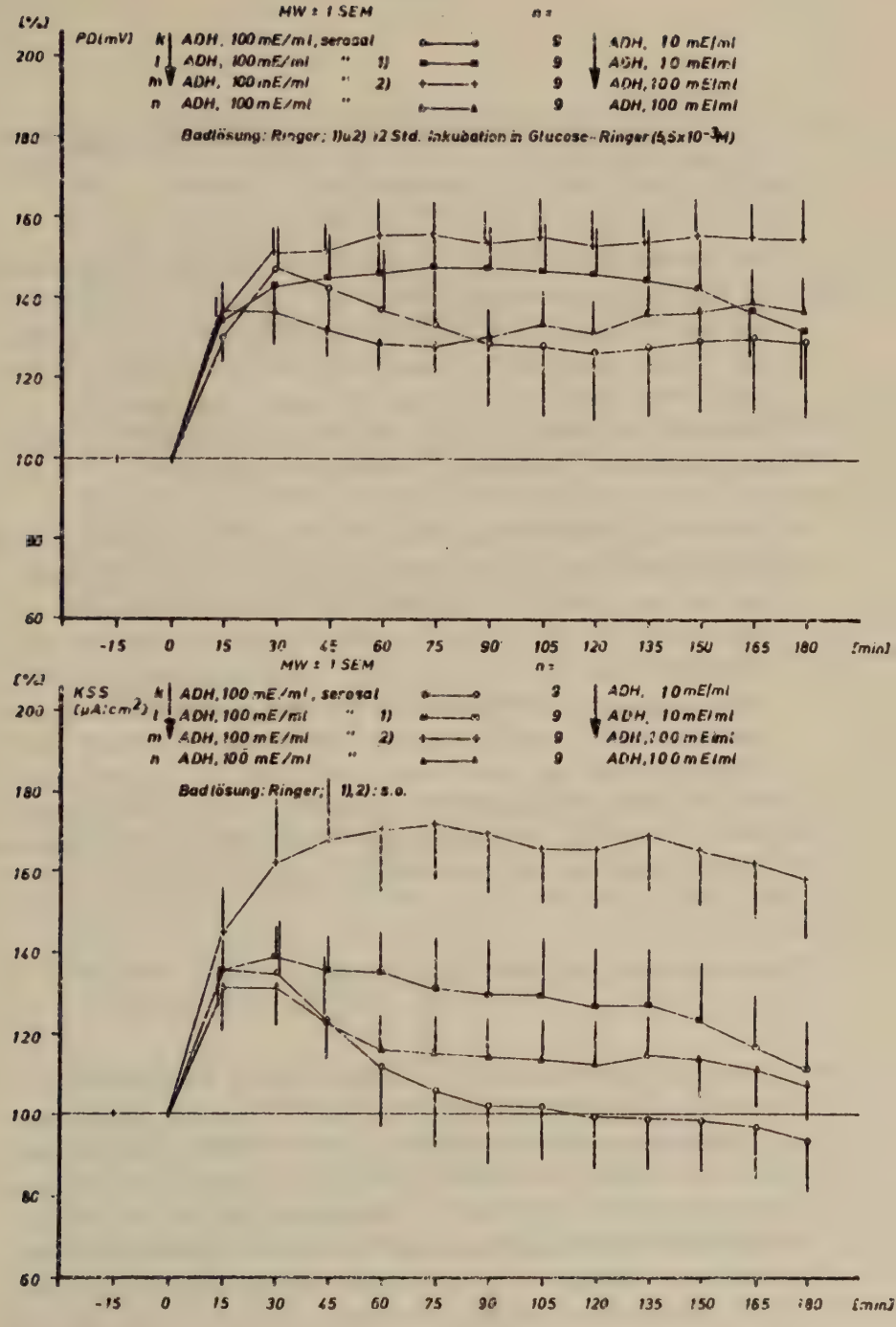

MW ± 1 SEM
n =
[%]
PD[mV]
k ADH, 100 mE/ml, serosal
l ADH, 100 mE/ml " 1)
m ADH, 100 mE/ml " 2)
n ADH, 100 mE/ml "
9 ADH, 10 mE/ml
9 ADH, 10 mE/ml
9 ADH, 100 mE/ml
9 ADH, 100 mE/ml
Badlösung: Ringer; 1)u2) =2 Std. Inkubation in Glucose-Ringer (5,5x10⁻³M)
200
180
160
140
120
100
80
60
-15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 [min]
MW ± 1 SEM
n =
[%]
KSS (µA/cm²)
k ADH, 100 mE/ml, serosal
l ADH, 100 mE/ml " 1)
m ADH, 100 mE/ml " 2)
n ADH, 100 mE/ml "
9 ADH, 10 mE/ml
9 ADH, 10 mE/ml
9 ADH, 100 mE/ml
9 ADH, 100 mE/ml
Badlösung: Ringer; 1),2): s.o.
200
180
160
140
120
100
80
60
-15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 [min]

Abb. 8

5) Prolaktin- und ADH-Effekte bei prolaktinvorstimulierten Membranen, Tab. 5

Zur Prüfung der kumulativen Wirkungen von ADH und Prolaktin an der Froschhaut wurde untersucht, ob ADH, das zur Zeit der noch bestehenden Stimulierung durch Prolaktin zugegeben wurde, einen von der Kontrolle unterscheidbaren Effekt hatte. Als Kontrollen dienten Versuche, bei denen die Membranen mit ADH (10 mE/ml Badlösung) vorstimuliert wurden sowie eine Serie ohne jegliche Hormonzugabe.

Weiter wurde die Wirkung einer zweiten Prolaktingabe (80 mE/ml Badlösung) auf prolaktinvorstimulierte Membranen unter dem Gesichtspunkt der möglichen additiven Wirkung der ADH-Anteile in den Prolaktinpräparationen untersucht. In Tabelle 5 sind daher die Prozent- und Absolutwerte des jeweils maximalen Anstieges im Gefolge der ersten und zweiten Zugabe, d.h. die Differenz zwischen der in dem betrachteten Intervall maximal erreichten Größe des untersuchten Parameters und seinem Wert unmittelbar vor Zugabe, aufgeführt, sowie die im Verhältnis zu den Äquilibrierungswerten (100%-Niveau) maximal erreichten Stimulationswerte.

a) Änderungen der Potentialdifferenz

Sowohl prozentual als auch absolut führte im Falle einer Vorstimulation der Membranen mit ADH (10 mE/ml Badlösung) der Spannungszuwachs nach der zweiten Stimulierung durch ADH (100 mE/ml Badlösung) zu einer Gesamthöhe des Membranpotentials, die im Falle der Vorstimulation mit Prolaktin (80 mE/ml Badlösung) oder auch bei nicht vorstimulierten Membranen allein durch die abschließende Applikation von ADH (100 mE/ml Badlösung) erreicht wurde (Tab. 5o, 5p, 5q).

Dabei entsprach der maximale Gesamtanstieg bei nicht- sowie ADH-vorstimulierten Membranen im wesentlichen dem durch die - insgesamt - supramaximale ADH-Dosierung erzielbaren Effekt, während sich das Potential bei prolaktinvorstimulierten Membranen als Summe aus dem durch supramaximale ADH-Dosierung erzielten Anstieg und der zu dieser Zeit noch vorhandenen prolaktininduzierten Primärstimulation der Membranen darstellte (Tab. 5o, 5p, 5q).

Die Zugabe einer zweiten Prolaktindosis (80 mE/ml Badlösung) zu bereits prolaktinvorstimulierten Membranen zeigte dagegen keinen weiteren stimulierenden Effekt. Die eine Stunde nach dieser zweiten Prolaktingabe applizierte ADH-Dosis von 100 mE/ml Badlösung bewirkte jedoch einen Anstieg ADH-typischer Größenordnung (Tab. 5r).

b) Änderungen des Kurzschlußstromes

Ähnlich wie bei den Membranpotentialen lagen die Verhältnisse bei den Kurzschlußströmen: die nach einmaliger ADH-Gabe (100 mE/ml Badlösung) bzw. als Summe nach zweimaliger ADH-Gabe (10 mE/ml und 100 mE/ml Badlösung) gemessenen Ströme übertrafen nicht die durch ADH-Stimulation überhaupt erzielbare Maximalhöhe im Gegensatz zur Summe prolaktin- und ADH-induzierter Teilströme (Tab. 5o, 5p, 5q).

Eine zweite Prolaktingabe zu prolaktinvorbehandelten Membranen hatte keine zusätzliche stimulierende Wirkung auf den KSS, sondern der zu diesem Zeipunkt bereits nachweisbare Abfall der KSS-Kurve setzte sich weiter fort. Die anschließende (t = 120 min) ADH-Gabe zeigte jedoch auch hier die typische Wirkung einer starken KSS-Stimulation (Tab. 5r).

Sowohl bei den Potentialdifferenzen als auch bei den Kurzschlußströmen ließ sich nachweisen, daß die auf das Zeitintervall bezogenen Änderungen nach der abschließenden ADH-Gabe in den Fällen, wo keine ADH-Applikation vorausgegangen war, stets signifikant ($P < .025$) größer waren als in den Fällen, wo bereits mit einer kleinen ADH-Dosis vorstimuliert worden war.

6) Wirkung des internationalen Prolaktinstandards NIH-P-S 12, Abb. 9

Es war möglich, zur Sicherung der mit Prolaktin-Ferring erhaltenen Ergebnisse einige Versuche mit dem internationalen Prolaktinstandard NIH-P-S 12 durchzuführen, dessen ADH-Anteil nur 3.6 µE/ml Badlösung betrug (/181/, s. Tab. 3). Auch für diese Experimente wurden die Membranen zum Teil 12 Stunden lang in Glucose-Ringer-Lösung inkubiert.

Tabelle 5 (nächste Seite) Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte der prozentualen (s.S. 30) und absoluten (in Klammern) Änderungen von PD und KSS nach Zugabe von ADH (100 mE/ml Badlösung) bzw. Prolaktin (PRL, 80 mE/ml Badlösung) auf ADH- und prolaktinvorstimulierte Bauchhaut von Rana temporaria. Zugabe erfolgte jeweils serosal.

Die Angaben in der letzten Spalte drücken den jeweiligen Anstieg über das 100%-Niveau bzw. den Äquilibrierungswert aus, die übrigen Daten wurden als jeweilige Differenzen des aktuellen Maximalwertes und des Wertes unmittelbar vor Zugabe im betrachteten Meßintervall berechnet.

**) Diese Daten bezeichnen nicht den maximalen Gesamtanstieg über das 100%-Niveau, sondern den durch eine ADH-Gabe (100 mE/ml Badlösung) zur Zeit t = 120 min bewirkten Strom bzw. Spannungszuwachs.*

	1. Zugabe t = 0 min		max. Anstieg über den aktuellen Wert bei der 1. Zugabe	2. Zugabe t = 75 min	max. Anstieg über den aktuellen Wert bei der 2. Zugabe	max. Gesamtanstieg über das Äquilibrierungsniveau
o	ø	PD (mV)	9.4% (3.3 ± 2.0)	ADH, 100 mE/ml	75.4% (27.9 ± 4.7)	84.4% (31.1 ± 6.6)
		KSS (µA/3.14 cm²)	0.0% (-0.1 ± 1.0)		63.4% (107.0 ± 21.6)	60.6% (102.0 ± 19.2)
p	ADH, 10 mE/ml	PD	35.0% (15.5 ± 3.3)	ADH, 100 mE/ml	43.0% (17.2 ± 4.1)	78.0% (32.7 ± 4.7)
		KSS	25.8% (38.0 ± 11.8)		32.7% (38.2 ± 19.8)	44.1% (66.0 ± 26.9)
q	PRL, 80 mE/ml	PD	51.2% (15.6 ± 3.9)	ADH, 100 mE/ml	111.1% (32.0 ± 5.5)	131.2% (37.7 ± 5.2)
		KSS	32.7% (45.7 ± 11.8)		74.7% (98.0 ± 30.7)	87.4% (117.3 ± 29.1)
r	PRL, 80 mE/ml	PD	62.4% (12.9 ± 3.1)	PRL, 80 mE/ml	1.5% (-0.6 ± 2.3)	100.7% *) (26.6 ± 7.1) *)
		KSS	32.2% (35.4 ± 7.7)		-10.6% (-8.6 ± 5.2)	75.7% *) (70.4 ± 22.9) *)

Tabelle 6

a) Änderungen der Potentialdifferenz

Qualitativ unterschied sich der Verlauf der Potentialdifferenz nicht inkubierter Membranen nach Zugabe des internationalen Prolaktinstandards nicht von dem nach Zugabe der "Prolaktin-Ferring" Präparationen. Der gegenüber der Kontrolle signifikante ($P < .025$) Abfall 15 min nach Zugabe erwies sich auch hier als für Prolaktin charakteristisch. Der anschließende Anstieg lag bei t = 45 min hochsignifikant über dem Kontrollniveau ($P < .0005$; Abb. 9s, 9d'). Quantitativ entsprach der Verlauf etwa dem, wie er nach Applikation von "Prolaktin-Ferring" in einer Dosierung von 390 mE/ml Badlösung erhalten wurde (Abb. 5a).

Die Potentiale glucoseinkubierter Membranen zeigten nach Standardprolaktingabe einen signifikanten Anstieg gegenüber den zugehörigen Kontrollen erst nach 60 min ($P < .025$; Abb. 9t, 9i').

b) Änderungen des Kurzschlußstromes

Auch der KSS wies ein qualitativ gleiches Verhalten nach Gabe des Standardprolaktins wie nach "Prolaktin-Ferring" auf und übertraf mit der typischen Latenz nach 45 min statistisch signifikant den Kontrollwert ($P < .05$; Abb. 9s, 9d'). Der Kurzschlußstrom war ähnlich hoch wie nach Gabe

---

Abb. 9 (nächste Seite) Einfluß des internationalen Prolaktinstandards NIH-P-S 12 auf PD und KSS der Bauchhaut von Rana temporaria. Zugabe serosal. Darstellung prozentualer Änderungen (s.S. 30; vgl. Tab. 2). s) Prolaktinstandard, 80 mE/ml Badlösung; t) Prolaktinstandard, 80 mE/ml Badlösung, Inkubation in Glucose-Ringer-Lösung; d') Kontrolle: keine Zugabe; i') Kontrolle: keine Zugabe, Inkubation in Glucose-Ringer Lösung. Versuchszeit: März 1979

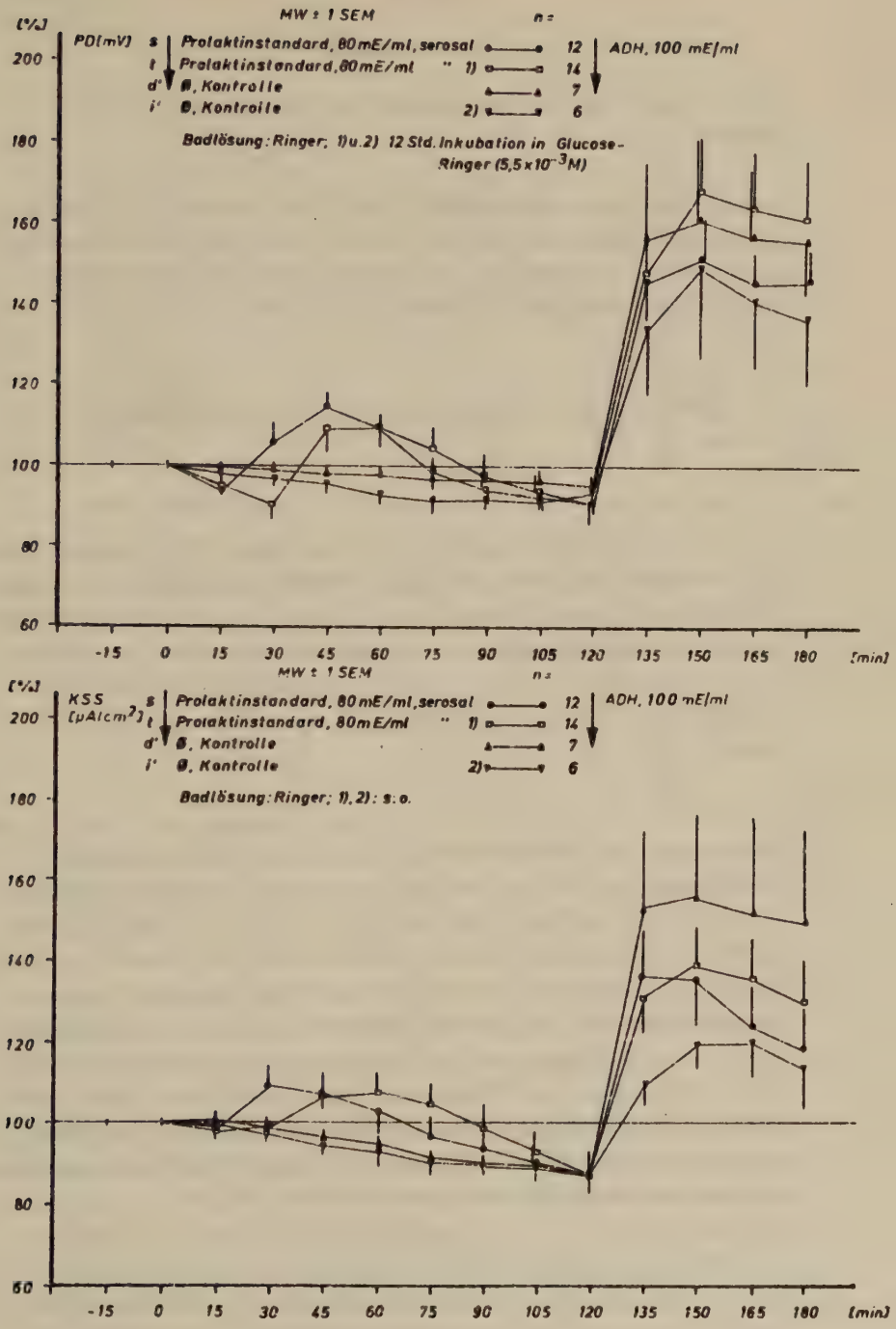

[%]
MW ± 1 SEM
n =
PD[mV]
s
t
d'
i'
Prolaktinstandard, 80 mE/ml, serosal
Prolaktinstandard, 80 mE/ml " 1)
Ø, Kontrolle
Ø, Kontrolle
2)
12
14
7
6
ADH, 100 mE/ml
Badlösung: Ringer; 1) u. 2) 12 Std. Inkubation in Glucose-Ringer (5,5 x 10⁻³ M)
200
180
160
140
120
100
80
60
-15
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
165
180
[min]
[%]
MW ± 1 SEM
n =
KSS
[µAlcm²]
s
t
d'
i'
Prolaktinstandard, 80 mE/ml, serosal
Prolaktinstandard, 80 mE/ml " 1)
Ø, Kontrolle
Ø, Kontrolle
2)
12
14
7
6
ADH, 100 mE/ml
Badlösung: Ringer; 1), 2): s. o.
200
180
160
140
120
100
80
60
-15
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
165
180
[min]

Abb. 9

von "Prolaktin-Ferring" in der Dosierung von 390 mE/ml Badlösung.

Bei Inkubationsexperimenten fand sich jedoch nach Zugabe von Standardprolaktin (NIH-P-S 12, 80 mE/ml Badlösung) ein gegenüber der Kontrolle zur Zeit t = 45 min mit $P < .025$ signifikant höherer Kurzschlußstrom (Abb. 9t, 9i').

7) Jahreszeitlich Abhängigkeit des Prolaktineffektes, Tab. 6

Es ist bekannt, daß hormonal induzierbare Einflüsse auf die elektrische Aktivität isolierter Membranen jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen sind. So zeigten auch hier Membranen von Frühjahrstieren, bei gleicher Dosierung der Pharmaka, regelmäßig eine bessere Stimulierbarkeit von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom als solche von Wintertieren.

In Tabelle 6 wurde daher zur Verdeutlichung der Einfluß der Jahreszeit auf die absoluten und prozentualen maximalen Änderungen von PD und KSS nach Gabe von Prolaktin ("Prolaktin-Ferring", 80 mE/ml Badlösung) und ADH (100 mE/ml Badlösung) dargestellt. Dabei zeigte sich, daß in der Tat die absoluten und relativen prolaktininduzierten Anstiege von Membranpotential und Kurzschlußstrom, sowohl im Falle der Inkubation der Membranen in Glucose-Ringer-Lösung als auch ohne Inkubation, an Häuten von Frühjahrstieren höher ausfielen als an Häuten von Wintertieren. Im Gegensatz hierzu erwies sich der ADH-induzierte Anstieg als relativ unabhängig vom Wechsel der Jahreszeit (s. Tab. 6).

		1.Zugabe t = 0 min	max. Anstieg nach 1. Zugabe	2.Zugabe t = 120 min	max. Anstieg nach 2. Zugabe
b' Feb. 79 nicht inkubiert	PD (mV)	PRL,	2.7% (1.2 ± 2.8)	ADH,	41.1% (16.6 ± 3.6)
	KSS (µA/3.14 cm²)	80 mE/ml	2.9% (5.1 ± 9.2)	100 mE/ml	25.8% (32.7 ± 5.6)
b'' Mai 79 nicht inkubiert	PD	PRL,	59.5% (15.6 ± 5.9)	ADH,	57.0% (16.0 ± 3.9)
	KSS	80 mE/ml	30.1% (23.1 ± 8.0)	100 mE/ml	43.9% (31.5 ± 13.3)
e' Jan. 79 inkubiert	PD	PRL,	3.7% (1.0 ± 2.2)	ADH,	84.3% (34.0 ± 4.2)
	KSS	80 mE/ml	21.8% (16.7 ± 5.6)	100 mE/ml	94.7% (72.1 ± 10.1)
e'' März 79 inkubiert	PD	PRL,	23.0% (7.4 ± 2.2)	ADH,	104.1% (31.9 ± 9.3)
	KSS	80 mE/ml	27.8% (24.0 ± 6.9)	100 mE/ml	81.3% (73.9 ± 18.1)

Tabelle 6 Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte der relativen (s.S. 30) und absoluten (in Klammern) maximalen Änderungen von PD und KSS der Bauchhaut von Rana temporaria nach Gabe von Prolaktin-Ferring (80 mE/ml Badlösung) und ADH (100 mE/ml Badlösung) zu Glucose-inkubierten und nicht inkubierten Membranen. Darstellung der jahreszeitlichen Abhängigkeit des Prolaktineffektes, der - im Gegensatz zur ADH-Wirkung - im Frühjahr signifikant größer war als im Winter.

C) Prolaktinwirkungen an der isolierten Krötenhaut (Bufo bufo)

Im Gegensatz zur isolierten Bauchhaut des Frosches ist der spontane transepitheliale Wasserfluß bei Kröten (Bufo bufo) größer und damit experimentell leichter meßbar. Um zu überprüfen, ob Prolaktin - ähnlich wie ADH - den hydroosmotischen Wasserfluß beeinflußt, wurden orientierende Versuche auch an dieser Spezies durchgeführt.

a) Änderungen von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom

Die bisher beschriebenen stimulierenden und charakteristischen Wirkungen von Prolaktin auf PD und KSS der Membranen von Rana temporaria konnten an den Krötenmembranen nicht nachgewiesen werden. Auch 12-stündige Inkubation in Glucose-Ringer-Lösung förderte nicht die Stimulation der elektrischen Parameter.

b) Änderungen des hydroosmotischen Wasserflusses

Die als Summe aus vier viertelstündlichen Wasserflußmengen

Abb. 10 (nächste Seite) Einfluß von Prolaktin-Ferring auf den hydroosmotischen Wasserfluß isolierter Membranen (Bauchhaut) von Bufo bufo. Zugabe serosal. Darstellung der absoluten, aus je vier in viertelstündlichen Einzelmessungen gewonnenen Wasserflußsummen pro Stunde.
u) Prolaktin, 80 mE/ml Badlösung; v) Kontrolle: keine Zugabe; w) Prolaktin, 80 mE/ml Badlösung, Inkubation in Glucose-Ringer-Lösung; x) Kontrolle keine Zugabe, Inkubation in Glucose-Ringer-Lösung. Versuchszeit: Mai 1979

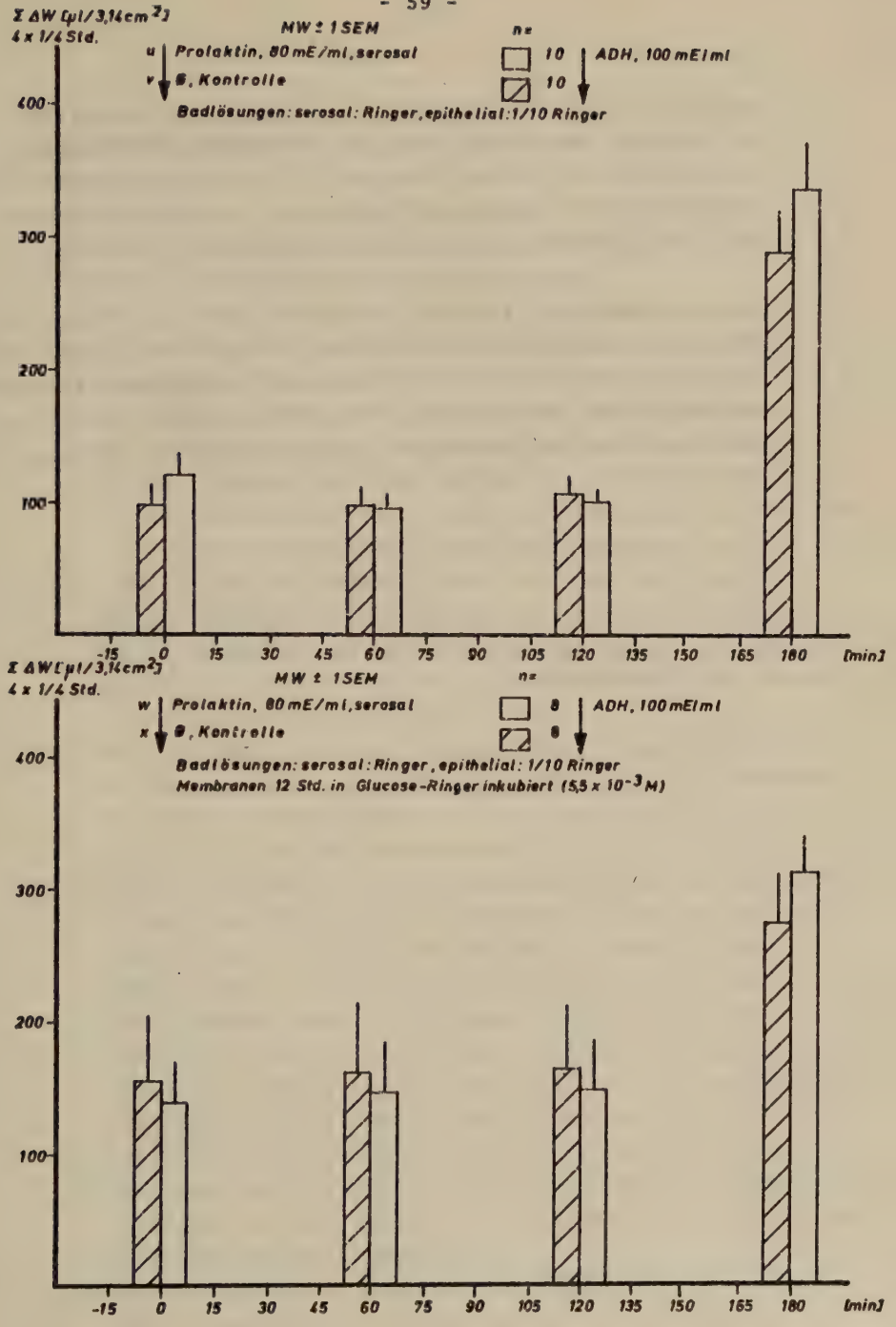

Σ ΔW (µl/3,14cm²)
4 x 1/4 Std.
MW ± 1 SEM
n=
u Prolaktin, 80 mE/ml, serosal
10
ADH, 100 mE/ml
v 6, Kontrolle
10
Badlösungen: serosal: Ringer, epithelial: 1/10 Ringer
400
300
200
100
-15
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
165
180
[min]
Σ ΔW (µl/3,14cm²)
4 x 1/4 Std.
MW ± 1SEM
n=
w Prolaktin, 80 mE/ml, serosal
8
ADH, 100 mE/ml
x 6, Kontrolle
8
Badlösungen: serosal: Ringer, epithelial: 1/10 Ringer
Membranen 12 Std. in Glucose-Ringer inkubiert (5,5 x 10⁻³ M)
400
300
200
100
-15
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
165
180
[min]

Abb. 10

gemessenen Flußraten unterschieden sich nach Prolaktingabe (80 mE/ml Badlösung) nicht von Kontrollen ohne Zugabe. Die Reaktion auf ADH war dagegen in beiden Experimenten ausgeprägt und der zugehörige Wasserfluß lag hochsignifikant über dem Äqulibrierungsniveau ($P < .0005$; Abb. 10u, 10v).

Ähnlich verhielten sich die Flußraten, wenn die Membranen 12 Stunden in Glucose-Ringer-Lösung vorinkubiert waren: wieder waren keine Unterschiede zwischen Prolaktinexperimenten und Kontrollen feststellbar. Die anschließende Reaktion auf ADH aber überstieg in beiden Fällen signifikant das Äquilibrierungsniveau ($P < .025$; Abb. 10w, 10x).

V. Diskussion

Die hier vorgelegten experimentellen Befunde lassen sich zunächst folgendermaßen zusammenfassen:

1) Prolaktin (PRL) wirkte an der isolierten Bauchhaut von Rana temporaria qualitativ anders als ADH, denn
   a) seine stimulierende Wirkung trat mit eine Latenz ein;
   b) seine Wirkung stellte kein Komplement zur maximalen ADH-Wirkung dar;
   c) es verminderte initial den Hautwiderstand und bewirkte einen biphasischen Verlauf der Spannungskurve.
2) Diese Wirkungen wurden sowohl mit "Prolaktin-Ferring" als auch mit dem Prolaktinstandard NIH-P-S 12 erzielt.
3) Der Wirkungsverlauf von PRL und ADH zeigte den gleichen zeitlichen Abstand des Stimulationsmaximums zum Beginn des stimulierenden Wirkungseintrittes.
4) Der PRL-Effekt schien substratabhängig zu sein, da bei Wintertieren nach 12-stündiger Inkubation der Membranen in Glucose-Ringer-Lösung ein signifikant höherer Stimulus auf PD und KSS nach PRL-Gabe erhalten wurde.
5) Die Glucoseinkubation hatte keinen Einfluß auf die ADH-stimulierte Aktivität der Membranen: es traten keine Unterschiede in der Höhe von PD und KSS mit und ohne Vorinkubation in Glucose-Ringer-Lösung auf, aber die Stimulationshöhe wurde über längere Zeit beibehalten.
6) Die Stärke der PRL-Wirkung war jahreszeitabhängig: Frühjahrstiere zeigten auch ohne Inkubation der isolierten Haut in Glucose-Ringer-Lösung einen starken Anstieg des aktiven Transportes (KSS und PD) auf PRL.
7) PRL besaß speziesspezifischen Einfluß auf die elektrische Aktivität der Bauchhaut von Rana temporaria, der bei Bufo bufo nicht erhalten wurde.
8) PRL führte an der isolierten Bauchhaut von Bufo bufo zu keiner Zunahme des hydroosmotischen Wasserflusses.

Bevor Einzelaspekte dieser Befunde diskutiert werden, sind zwei grundsätzliche Feststellungen angezeigt:

1) Bei der hier nachgewiesenen eigenständigen Wirkung des Prolaktin auf die elektrische Aktivität der isolierten Bauchhaut von Rana temporaria wurde die Größe des gemessenen Kurzschlußstromes als direktes Maß für den Natrium-Netto-Transport gewertet. Berechtigung und Begründung dieses Vorgehens wurden eingangs ausführlich diskutiert (s.S. 7). Nachdem jedoch bidirektionale Natriumfluxraten im kurzgeschlossenen Zustand der Membran nicht von uns gemessen worden sind, bleibt ein Rest an Unsicherheit.

2) Die zum Nachweis der hier beschriebenen Prolaktin-Effekte verwendeten Dosen lagen in einem unphysiologisch hohen Bereich und schränken daher naturgemäß Aussagen über die physiologische Bedeutung der hier nachgewiesenen Natriumtransport-stimulierenden Wirkung ein. Dies sollte daher auch bei der nachfolgenden Diskussion von Einzelaspekten generell in Rechnung gestellt werden.

Bei allen Experimenten fiel die Potentialdifferenz (PD) unmittelbar nach Zugabe von Prolaktin (80 mE/ml Badlösung) auf der serosalen Badseite signifikant um etwa 5% unter den Kontrollwert. Ausnahmen stellten die Experimente dar, bei denen die vierfache Dosis Prolaktin (390 mE/ml Badlösung) verwendet wurde oder die im Frühjahr durchgeführt wurden: hier stieg die PD nach 15 min leicht an. Die dazugehörigen Kurzschlußströme blieben dabei im Mittel gleich oder tendierten leicht nach höheren Werten, wobei aber 5% mit Ausnahme bei den Versuchen, die im Frühjahr stattgefunden haben, nicht überschritten wurden. Diese

initiale Widerstandserniedrigung der Haut und die damit verbundene Verzögerung des Beginns der Stimulationswirkung um ca. 30 min bildeten das Hauptcharakteristikum der Prolaktinwirkung.

Bei den Potentialdifferenzen betrug das aus zehn Prolaktinserien ermittelte durchschnittliche Verhältnis der Anstiege in der zweiten Meßperiode zu denen während der ersten 1.741 (± 0.209 SEM), bei den Kurzschlußströmen 6.90 (± 2.06 SEM). Eine analoge Berechnung lieferte bei allen durchgeführten ADH-Versuchen folgende Mittelwerte der genannten Verhältnisse: 0.28 (± 0.06 SEM) für die PD und 0.16 (± 0.07 SEM) für den Kurzschlußstrom (KSS). Dieser Quotient drückte für die Prolaktinexperimente in der zweiten Meßperiode eine deutliche Zunahme, für die ADH-Experimente eine deutliche Abnahme des Anstieges der zeitbezogenen elektrischen Parameter aus (s. Tab. 7). Diese Mittelwerte unterschieden sich mit $P < .0005$ für die PD und $P < .0025$ für den KSS hochsignifikant voneinander.

Das Phänomen des verzögerten Stimulationsbeginns nach PRL-Gabe mit dem in der zweiten Viertelstunde regelmäßig auftretenden Maximum der Wirkungssteigerung zeigte sich im prinzipiell gleichartigen Verlauf aller PD und KSS-Kurven der Prolaktinexperimente. Zur Verdeutlicheung wurde der Korrelationskoeffizient aus den relativen Veränderungen der ersten vier Ableseperioden ermittelt. Er betrug z.B. für die Potentialdifferenzen der beiden Prolaktinkurven der Abb. 6g und 6e $r = 0.927$. Im Vergleich der Prolaktinkurve 6g mit der Kontrollkurve 5d berechnete er sich zu $r = 0.044$. Für die Kurzschlußströme ergaben die entsprechenden Berechnungen beim Ver-

Zeit (Minuten nach Zugabe von)		0	15	30
Veränderung der Potentialdifferenz	PRL	0	-16	+18
	ADH	0	+36	+ 8
Veränderung des Kurzschlußstromes	PRL	0	+ 2	+11
	ADH	0	+36	+ 5

Tabelle 7 Darstellung der gemittelten Veränderungen von Potentialdifferenz (mV) und Kurzschlußstrom (µA/3.14 cm²) 15 und 30 min nach Zugabe von Prolaktin und ADH. Der größte Anstieg wird bei Prolaktin erst nach 30 min erreicht, während er bei ADH bereits nach 15 min voll ausgeprägt ist. Es wurden jeweils die absoluten Strom- und Spannungsanstiege von je 10 Experimenten gemittelt.

gleich der beiden Prolaktinkurven 6g und 6e r = 0.884, beim Vergleich der Prolaktinkurve 6g mit der Kontrolle 5d dagegen r = 0.138.

Die Höhe des KSS und der PD erreichte bei allen Prolaktinexperimenten 45 bis 60 min nach Zugabe ein Maximum, das häufig plateauförmig ausgebildet war und dem i.a. ein kontinuierlicher Abfall folgte, der bei den Potentialdifferenzen oft nahezu linear verlief. Ein ähnliches Bild zeigten die Potentialdifferenzen und Kurzschlußströme der Membranen, die mit ADH behandelt wurden. Allerdings fielen die Werte nicht in dem Maße ab wie nach Stimulation durch Prolaktin. Die zeitliche Verzögerung des Eintritts der stimulierenden Wirkung von Prolaktin gegenüber ADH und der schnelle, nicht zu einem steady-state führende gleichmäßige Abfall der durch PRL-Wirkung gestiegenen elektrischen Membranparameter mußten als Hinweise auf qualitative Unterschiede im Wirkmechanismus beider Substanzen gewertet werden.

Es war praktisch auszuschließen, daß die Verzögerung des stimulierenden Wirkungseintritts auf die verringerte Elektrolytbeweglichkeit des im Vergleich zu ADH (MG 1084) relativ großen Prolaktinmoleküls (MG 23 000) zurückzuführen war. Auf der Grundlage der Bewegung eines Teilchens in einer viskösen Flüssigkeit errechnete sich, ungeachtet der elektrischen Mikroverhältnisse im System, mit den entsprechenden Molekulargewichten bei Annahme kugelförmiger Gestalt eine um 64% geringere Beweglichkeit des PRL gegenüber dem ADH. Bei Anwesenheit einer Hydratationshülle um die Moleküle verschiebt sich die Beweglichkeitsrelation zugunsten des Prolaktin. Zur Berechnung wurde folgende Beziehung verwendet:

$$R = 6\pi\eta vr$$

(R Widerstand der Teilchenbewegung
η Viskosität der Flüssigkeit
v Geschwindigkeit des Teilchens
r Radius des Teilchens)

Nach dieser Betrachtung müßte das PRL bereits nach 15 min eine Stimulationswirkung entfaltet haben, da die Wirkung des ADH sofort nach Zugabe einsetzte und nach 15 min bereits den stärksten Anstieg von PD und KSS erzielt hatte. In den vorliegenden Untersuchungen fand man eine stimulierende Prolaktinwirkung aber erst nach 30 min, doch schon nach 15 min einen charakteristischen, sicher auf Prolaktin zurückzuführenden Effekt in der Erniedrigung des Hautwiderstandes. Damit darf die Rolle der Molekülgröße für den hier beobachteten verzögerten stimulierenden Wirkungseintritt ausgeschlossen werden.

Unter der Annahme, daß das als "Verunreinigung" in den Prolaktinpräparationen enthaltene ADH den stimulatorischen Effekt erzeugte, hätten diese ADH-Anteile, unabhängig von gleichzeitig anwesendem Prolaktin, ihre Wirkung innerhalb der ersten Viertelstunde entfalten müssen, denn die abschließende obligate ADH-Gabe zu prolaktinstimulierten Membranen führte ausnahmslos zu sofortiger, starker Steigerung von PD und KSS. Zudem sprach die Tatsache, daß die durch Prolaktin 15 min nach Zugabe erniedrigte Potentialdifferenz signifikant unter den Kontrollwerten, die Wirkung einer niedrigen ADH-Dosis, ebenfalls 15 min nach Zugabe, aber signifikant über der Kontrolle lag, für die Annahme, daß nach der ersten Viertelstunde kein "verunreinigendes" ADH wirksam war (Abb. 5).

30 min nach Zugabe einer niedrigen ADH-Dosis von 1 mE/ml Badlösung betrug das Maximum der PD-Stimulation bei relativ

konstantem Verlauf 7.1%. Dieser Wert wurde auch von den meisten Prolaktinexperimenten erreicht, wobei deren Anstiege in der zweiten Viertelstunde nach Zugabe aufgrund des in den ersten 15 min erniedrigten Ausgangsniveaus sogar höher waren. Nach radioimmunologischen Messungen in ADH-RIA (s.S. 27f.; Tab. 3) lagen die ADH-Beimengungen der verwendeten Prolaktinpräparationen ("Prolaktin-Ferring") unter 50 µE/ml Badlösung, oft erheblich darunter, aber in jedem Fall sicher unter 100 µE/ml Badlösung und waren damit immer um mindestens 90% kleiner als die zu Kontrollzwecken verwendeten ADH-Dosen; und selbst deren Stimulationswirkungen wurden von den PRL-Experimenten übertroffen.

Besonders im Experiment mit einer Prolaktindosis von 390 mE/ml Badlösung wurde deutlich, daß der Stimulationseffekt auf die elektrische Aktivität der isolierten Froschhaut nicht nur vom "verunreinigenden" ADH allein bewirkt werden konnte, denn hier betrug die ADH-Beimengung weniger als 50 µE/ml Badlösung. Das Maximum der PD war dabei mit 18.1% aber mehr als doppelt so hoch wie beim Vergleichsexperiment mit einer 20 mal höheren ADH-Menge von 1 mE/ml Badlösung (Abb. 5a, 5c). Gleiches galt für den Kurzschlußstrom. Um etwa den Faktor 10 ausgeprägter fand man diese Erscheinung in den Experimenten der Tabelle 5, wo die Zugabe einer Prolaktinpräparation mit geringer ADH-"Verunreinigung" die Effekte einer ADH-Konzentration von sogar 10 mE/ml Badlösung übertraf (Tab. 5o, 5p, 5q).

Auch die Werte der Tabelle 5r sprachen eindeutig gegen eine alleinige Stimulation der elektrischen Membranaktivität durch ADH-Kontamination der Prolaktinpräparationen: aus Vorversuchen war bekannt, daß der Stimulationseffekt kleiner Dosen von ADH oder Oxytocin additiv durch weitere ADH-Gaben maximal zu steigern ist. Wäre nun der prolaktininduzierte Initialeffekt einer 30 min später einsetzenden star-

ken Stimulierung von PD und KSS (vgl. Tab. 5r) de facto von der geringen ADH-"Verunreinigung" verursacht worden, hätte der gleich große ADH-Anteil bei der zweiten Prolaktingabe zu einer erneuten Stimulation im gleichen Ausmaß führen müssen, was aber nicht der Fall war. Die abschließende Gabe von ADH zeigte demgegenüber unverminderte Stimulation.

Obwohl damit eine eigenständige, von der reinen ADH-Wirkung unterschiedene Wirkung des Prolaktin auf die isolierte Froschhaut erwiesen schien, lag doch auch ein Hinweis auf einen möglichen gemeinsamen Wirkcharakter vor: die Zeit vom Beginn der stimulierenden Wirkung bis zum Erreichen des Maximums betrug mit großer Regelmäßigkeit sowohl bei ADH- als auch bei Prolaktinexperimenten 30 Minuten. Dies führt zu der Frage, ob Prolaktin, nach einer zweifellos ablaufenden eigenständigen, nicht stimulatorischen Wirkung, auf der die initiale Verzögerung wie auch die Erniedrigung des Membranwiderstandes beruhen könnte, den ADH-Effekt verstärkt und so die Wirksamkeit der geringen "Verunreinigungsdosen" von ADH in den Prolaktinpräparationen erhöht (s.a. /192/). Wenn Prolaktin grundsätzlich die Wirkung von ADH an der Froschhaut fördert, hätte bei Experimenten mit Prolaktin der Effekt des obligat zugegebenen ADH höher als bei Experimenten ohne vorherige Prolaktinzugabe sein müssen. Entgegen dieser Erwartung zeigte jedoch der Vergleich der mittleren, ADH-induzierten Aktivitätszunahme der Kontrollserie ohne Prolaktinzusatz und der Serie mit Prolaktinzusatz keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Bedeutung alleiniger Glucoseinkubation für den ADH-Effekt war gering, wie Vergleiche der ADH-Wirkung (100 mE/ml Badlösung) an glucoseinkubierten und nicht inkubierten Membranen zeigten: es ergaben sich in keinem Fall statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 7, Abb. 8). Auch die Glu-

coseinkubation bei den als Standardkontrolle durchgeführten Experimenten mit NIH-P-S 12 Prolaktin führte zu keinem gesteigerten ADH-Effekt gegenüber den Experimenten ohne Glucoseinkubation. Somit bewirkte Glucoseinkubation allenfalls eine zeitliche Verlängerung des stimulierenden ADH-Effektes, während sich ein direkter Nachweis für eine prolaktininduzierte Verstärkung der ADH-Wirkung nicht führen ließ.

Es ist jedoch denkbar, daß sehr kleine submaximale Dosen von ADH durch Augmentation zu Prolaktin-induzierten elektrophysiologischen Änderungen führen und dadurch die als "Verunreinigung" in der Prolaktinpräparation enthaltenen Minimaldosen von ADH, die ohne Prolaktinzusatz keine meßbare Wirkung offenbaren, unter Prolaktin-"Augmentation" doch Membraneffekte zeigen. Eine wünschenswerte Prüfung dieser immerhin möglichen zwischenhormonalen Wechselwirkung mit Prolaktin und kleinen Dosen ADH scheitert jedoch daran, daß bisher keine völlig ADH-freie Prolaktinpräparation zur Verfügung steht, mithin also ein meßbarer Effekt nicht eindeutig als Summe eigenständiger stimulierender Prolaktinwirkung mit zusätzlicher ADH-Wirkung oder als durch Prolaktin verstärkte ADH-Wirkung interpretiert werden kann.

Vorstellbar erscheint ferner, daß eine Augmentation durch Prolaktin oder/und Glucose zum Zeitpunkt der ADH-Zugabe nach zweistündiger Prolaktininkubation nicht mehr möglich ist, weil durch enzymatische Prozesse das Prolaktinmolekül bereits verändert wurde, so daß fördernde Einflüsse des Prolaktin auf die ADH-Wirkung nicht mehr nachweisbar sind. In der Tat fielen die durch Prolaktinstimulation angestiegenen PD- und KSS-Kurven nach dem Durchgang durch ihr Maximum schnell wieder ab und hatten, wenn ADH zugegeben wurde, oft schon den Ausgangswert, teilweise erheblich, unterschritten. Nach Zugabe von ADH zu einem Zeitpunkt, als die Prolaktinwirkung noch nicht völlig abgeklungen war, kam es

dagegen zu einer zusätzlichen Steigerung der PD. Offensichtlich addierten sich hier die ADH- und PRL-Effekte. Die Größe dieses "Summenmembranpotentials" unterschied sich 15 min nach ADH-Zugabe statistisch signifikant von dem entsprechenden Potential im Kontrollexperiment ohne Zugabe ($P < .05$) und vom Potentialwert in einem zweiten Kontrollexperiment, bei dem eine reine ADH-Stimulation mit 10 mE/ml Badlösung vorausging ($P < .0125$). Eine reine, ein- oder zweizeitige, ADH-Stimulation führte immer nur zu einer bestimmten, durch ADH maximal erzielbaren Höhe der PD; sie konnte durch zusätzliche PRL-Stimulation, nicht aber durch erneute ADH-Gabe, additiv übertroffen werden (Tab. 5o, 5p, 5q). Die den Potentialdifferenzen zugehörigen Kurzschlußströme zeigten zwar prinzipiell gleiches Verhalten; eine statistische Signifikanz war jedoch nicht zu sichern (Tab. 5o, 5p, 5q).

Immerhin läßt sich aus diesen experimentellen Befunden schließen, daß der Angriffspunkt des Prolaktin bezüglich der Stimulation des transepithelialen Na^+-Transportes von dem des ADH verschieden ist und eine mögliche Augmentation des ADH durch Prolaktin über verschiedene Wege im Transportprozeß ablaufen muß.

Die Frage nach der Glucoseabhängigkeit der Prolaktinwirkung mußte auch vom Standpunkt der jahreszeitlichen Abhängigkeit der Hormoneffekte betrachtet werden: der starke stimulierende Einfluß des Prolaktin nach 12-stündiger Inkubation in Glucose-Ringer bei Membranen von "Wintertieren" verlor sich bei "Frühjahrstieren"; sie zeigten auch ohne Glucoseinkubation die höchste elektrische Aktivität nach Prolaktingabe (Tab. 6). Vermutlich stand den "aktiven" Frühjahrstieren ohnehin Glucose zur Verfügung, wohingegen es "passiven" Wintertieren, vielleicht durch Hemmung von Amylasen

oder aufgrund allgemeiner Stoffwechselreduktion im Winterschlaf, an freier Glucose mangelte.

Bemerkenswert war auch, daß, gegensätzlich zum Einfluß auf die ADH-Wirkung, die Glucoseinkubation bei Prolaktin nicht zu einer Verlängerung, wohl aber zu einer Steigerung der Stimulation führte. Die Kurven zeigten dann aber, nach dem Durchgang durch das Maximum, einen ausgeprägten Abfall wie bei nichtinkubierten Membranen (Abb. 6e).

Eine positive Korrelation zwischen der Tiefe des initialen PD-Abfalles und der Höhe der Stimulation nach Prolaktingabe konnte nicht allgemein festgestellt werden und das Maß der vorausgehenden Potentialerniedrigung war in keinem Fall hinreichendes Kriterium für den darauffolgenden Wiederanstieg.

Jahreszeitliche Abhängigkeiten

Neben einem möglichen Einfluß der Jahreszeit auf den Betriebsstoffwechsel der Tiere und die Auswirkungen auf Hormoneffekte wurde von verschiedenen Autoren ein direkter Einfluß auf den Hormon- und Elektrolythaushalt beschrieben. Gegen Ende der Überwinterung und während der Brutsaison fand sich eine starke Aktivität hypothalamischer sekretorischer Granula /129/. Zunehmende Temperatur steigerte den spontanen Natriumtransport, nicht aber die Wirkung von Vasopressin /61/ und im Mai war bei Rana pipiens ein Natriumgipfel in der Urinausscheidung nachzuweisen /45/. Auch die Wasserpermeabilität nahm zum Sommer hin zu /133/. Ebenfalls schien ein prolaktinhemmendes Prinzip im Frühling unterdrückt zu werden /97/, so daß die in der hier vorgelegten Untersuchung beobachtete, besonders gute Reagibilität der Froschhäute auf Prolaktin im Frühsommer auf sehr unter-

schiedliche, im Lebenszyklus der Tiere begründete Faktoren zurückzuführen sein mag.

Bevor die von uns beobachtete fehlende Reaktion der elektrischen Aktivität nach Prolaktingabe jedoch als für die Kröte Bufo bufo speziesspezifisch bezeichnet werden kann, müssen weitere systematische Untersuchungen erfolgen. So bleibt dabei zu berücksichtigen, daß der Hautwiderstand der Kröten in den durchgeführten Versuchen generell doppelt so hoch war wie bei den Fröschen.

Eine Änderung des hydroosmotischen Wasserflusses wurde ebenfalls von Prolaktin weder bei glucoseinkubierten noch bei nicht inkubierten Membranen bewirkt, in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Literatur, wonach Prolaktin an verschiedenen Geweben den hydroosmotischen Wasserfluß sogar senkte /44, 82, 92, 101/. Demgegenüber reagierten die Krötenmembranen eindeutig und hochsignifikant mit einer typischen Erhöhung des transepithelialen Wasserflusses nach ADH-Gabe (100 mE/ml Badlösung; $P < .0025$; Abb. 10).

Die Tatsache, daß in der Zeit der primären Prolaktinwirkung das Membranpotential stärker abfiel als der Strom, wie dies bei Versuchen mit Rana temporaria immer wieder zu beobachten war, daß also der elektrische Hautwiderstand erniedrigt wurde, wie auch bei Krötenmembranen festzustellen war, kann nach dem Schema der Tabelle 1 als Zunahme der Membranpermeabilität für Anionen aufgefaßt und damit als Hinweis auf die Leistungen des Prolaktin an der Zellmembran und auf mögliche Einflüsse auf parazelluläre Transportwege gewertet werden.

Versuch einer "physiologischen Deutung" des Prolaktin-effektes

Nach Rosen et al. und Sapag-Hagar et al. /145,150/ stimuliert Prolaktin keine Basenzyklasen und sind mit c-3′:5′ AMP auch keine spezifischen Prolaktineffekte zu erhalten. Dagegen kann der ADH-Effekt an der Membran durch c-3′:5′ AMP imitiert werden, wie auch ADH selbst die Adenylzyklase stimuliert. Obwohl es Hinweise gibt, daß ADH an der apikalen und basalen Zellmembran einwirkt /1,2,58,59,144/, sprechen die Ergebnisse der Mikroelektrodenuntersuchungen von Nagel /124/ dafür, daß in erster Linie der Natriumeinstrom, ausgedrückt in einer Erniedrigung des Widerstandes der apikalen Zellmembran, durch ADH gefördert wird, während die basale Zellmembran ihren Widerstand nach ADH-Gabe erhöht. Legt man einen Einfluß des Prolaktin an der basalen Membran in Form einer Stimulierung oder Vermehrung der ^{3}H-Ouabain-markierbaren Na^{+}-K^{+}- ATPase zugrunde /14,51,54,81,107,150,168/, so läßt sich daraus die Vorstellung einer möglichen Förderung der ADH-Wirkung durch Prolaktin über folgenden Mechanismus ableiten: der verstärkte Stimulus auf die "Na^{+}-Pumpe" durch den als Folge der ADH-Wirkung vermehrten intrazellulären Natriumgehalt führt zu einem erhöhten Natriumausstoß aus der Zelle, der durch Vermehrung (Proteinsynthese) oder Aktivierung dieser "Pumpen" weiter vergrößert werden kann. In diesem Fall wäre dann der über die apikale Membran vermittelte Natriumeinstrom in die Zelle auch für die Prolaktinwirkung ein limitierender Faktor.

In Mikroelektrodenuntersuchungen *) konnten mit den in vor-

---

*) durchgeführt von Prof. Nagel, Physiologisches Institut der Universität München, persönliche Mitteilung

liegender Arbeit verwendeten Prolaktinpräparationen in der Tat unterschiedliche Angriffspunkte des ADH und PRL an der Einzelzelle der Bauchhaut von Rana temporaria wahrscheinlich gemacht werden: während ADH den apikalen Zellwiderstand erniedrigt und das apikale Potential daher abfällt /124/, blieben diese beiden Parameter nach Prolaktingabe nahezu unverändert. Da jedoch der transepitheliale Kurzschlußstrom durch Prolaktin stimuliert wurde, kann der Wirkort des Prolaktin für die stimulierenden Effekte nur als an der basalen Zellseite gelegen angenommen werden. In einem weiteren derartigen Experiment mit Prolaktin waren dann keine intrazellulären Prolaktinwirkungen zu finden, wenn eine Stimulation der Membran mit Insulin vorausgegangen war. Dagegen zeigte das anschließend zugegebene ADH seine volle Wirkung.

Wenn ausschließlich und unabhängig vom Natriumgehalt der Zelle die Extrusion von Natrium aus der Zelle von Prolaktin angeregt wird, (s.a. /53,168/ an der Säugerzelle), so muß, wenn nicht der Natriumeinstrom auch gefördert wird, nach kurzer Zeit das Zellinnere stark an Natrium verarmen und demzufolge die Stimulation der Transportprozesse zum Erliegen kommen. Diese Überlegung ist konsistent mit den Befunden, daß die PD- und KSS-Kurven nach Stimulation durch Prolaktin praktisch linear und kontinuierlich fallen.

Hieraus ließen sich zwei Folgerungen ableiten:

1) An der apikalen Zellmembran erfolgt kein genügend großer Natriumeinstrom zur Aufrechterhaltung der durch Prolaktin bewirkten Stimulation.
2) Es wird erklärbar, warum selbst kleine Mengen an ADH im Verein mit der diskutierten Prolaktinwirkung der Enzymsynthese einen deutlichen Effekt zeigen: schon geringfügige Erhöhung des Natriumeinstromes in die Zelle bleibt

bei durch Prolaktin oder seine intrazellulären Intermediärprodukte stark aktivierten oder vermehrten "Natriumpumpen" nicht ohne Einfluß auf das Maß des transzellulären Natriumtransportes, wenn, insbesondere nach intrazellulärer Natriumverarmung durch erhöhten Natriumausstoß infolge des Prolaktineinflusses, die elektrostatischen Kräfte für passive Transportvorgänge an der apikalen Membran verstärkt werden.

Unabhängig davon muß man jedoch annehmen, daß intrazelluläre Natriumverarmung sekundär einen direkten Einfluß an der apikalen Membran, z.B. in Form der Erniedrigung des Eingangswiderstandes, ausübt (s.a. /177/).

Ob und in welcher Weise Prolaktin den Anionentransport beeinflußt, wurde in vorliegender Arbeit nicht untersucht. Dennoch bleibt festzustellen, daß speziell aus der Erniedrigung des Membranwiderstandes durch Prolaktin bei konstantem Strom auf eine Erhöhung der Anionenpermeabilität geschlossen werden muß.

Abb. 11 enthält den Versuch einer schematischen Darstellung, über welchen Wirkmechanismus die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erklärt werden könnten:
ADH stimuliert die intramembranal gelegene Adenylzyklase, die ATP in zyklisches AMP und Pyrophosphat umwandelt. Dies führt schließlich zu einer Aktivierung der Na^+-K^+- ATPase.

Prolaktin hingegen scheint einen direkten Einfluß auf die Na^+-K^+- ATPase zu nehmen. Nach einer Latenzzeit von 30 Minuten steigt der Kurzschlußstrom, Ausdruck der Stimulierung des Na^+-Transportes, signifikant an. In dieser Zeit laufen Stoffwechselvorgänge ab, die in einer Neusynthese des Enzyms Na^+-K^+- ATPase bestehen oder deren Metaboliten die zusätzliche Aktivierung der vorhandenen Na^+-K^+- ATPase bewirken. Bei Wintertieren kann der Prolaktineffekt durch In-

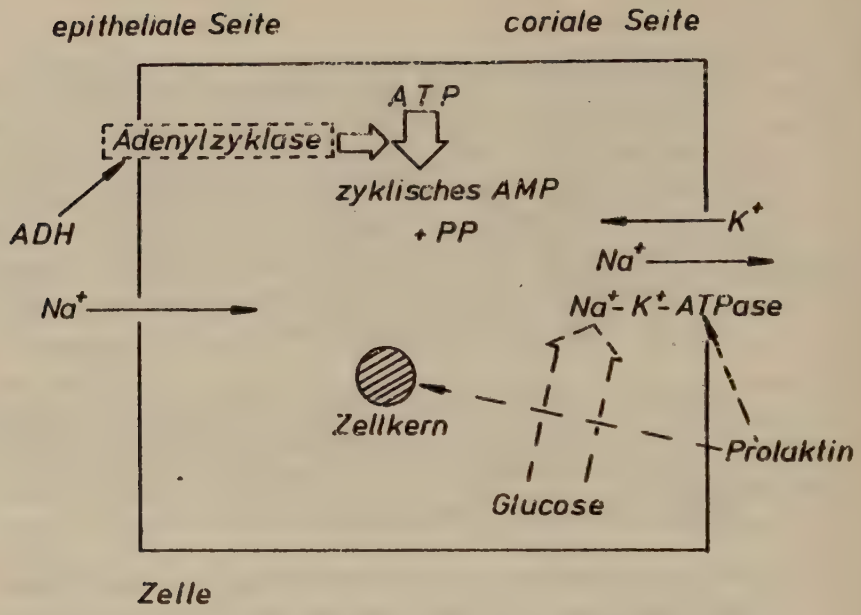


Abb. 11 Versuch einer schematischen Darstellung des möglichen Wirkmechanismus des Prolaktineffektes an der transportaktiven Zelle der Amphibienmembran. Näheres im Text.

kubation der Membranen in Glucose-Ringer-Lösung stark gesteigert werden.

Naturgemäß bedarf es eingehender biochemischer Analysen auf zellulärer und subzellulärer Ebene, um die Richtigkeit derartiger hypothetischer Vorstellungen zu beweisen. Schließlich muß die Frage offen bleiben, ob und wenn ja, in welchem Umfang einem Natriumtransport-stimulierenden Effekt des Prolaktin physiologische Bedeutung im Rahmen der Osmoregulation bei höher entwickelten Tieren zukommt. So könnten sich Parallelen zur Wirkungsweise des Antidiuretischen Hormons ergeben, das seinen bei Amphibien deutlich ausgeprägt-

ten Natriumtransport-stimulierenden Effekt in der Säugetierniere weitgehend verliert. Die hier nachgewiesenen Wirkungen des Prolaktin an der isolierten Amphibienmembran könnten sich jedoch unabhängig davon als Modellversuch für die weitere Analyse des hormonalen Wirkmechanismus erweisen.

VI, ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer einleitenden Problemstellung, die auf die Frage nach einem eigenständigen Einfluß des Prolaktin auf transepitheliale Wasser- und Elektrolytbewegungen abzielt, wurde zunächst das dazu in der Literatur vorgefundene Material diskutiert und die Bedeutung der isolierten Amphibienmembran als experimentelles "Transportmodell" erläutert.

In eigenen Versuchen an der isolierten Bauchhaut von Rana temporaria mit Hilfe der Ussing'schen Kurzschlußstrommethode konnte ein qualitativ eindeutiges Wirkprofil des Prolaktin in verschiedenen Konzentrationen und nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Membranen gefunden werden, das sich eindeutig von der Wirkung des ADH abgrenzen ließ. Zusätzlich wurden in den verwendeten Prolaktinpräparationen die Prolaktin- und ADH-Mengen radioimmunologisch gemessen und der Einfluß der dabei erhaltenen, nur geringen ADH-Konzentrationen auf die elektrischen Eigenschaften der Membranen, auch im Hinblick auf eine mögliche Verstärkung durch Zusammenwirkung mit Prolaktin überprüft und diskutiert.

Im Gegensatz zu den eindeutigen Effekten des Prolaktin an der Bauchhaut von Rana temporaria ließ sich an der Bauchhaut von Bufo bufo weder ein sicherer Effekt auf die elektrischen Membranparameter noch ein Einfluß auf den hydroosmotischen Wasserfluß nachweisen.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1) Prolaktin (PRL) senkte initial den Membranwiderstand
2) Nach einer Latenzzeit von 30 Minuten stimulierte PRL jahreszeit- und dosisabhängig PD und KSS
3) PD und KSS erreichten nach Prolaktingabe keinen steady

state Zustand

4) 12-stündige Inkubation der Membranen in Glucose-Ringer-Lösung förderte an Membranen von Wintertieren den Prolaktin-induzierten aktiven Na^+- Transport (KSS)
5) Die Häute der Frühjahrstiere zeigten signifikant höhere stimulatorische Reaktionen auf PRL als die von Wintertieren
6) PRL zeigt an der isolierten Bauchhaut von Bufo bufo keinen Einfluß

Abschließend werden anhand dieser Ergebnisse mögliche Wirkmechanismen des Prolaktin in transportaktiven Epithelien diskutiert. Sichere Aussagen über die zellulären Einzelschritte und über die "physiologische" Bedeutung der erhobenen Befunde sind zwar nicht möglich, aber unabhängig davon könnte ihr Wert im Modellcharakter für die Analyse hormonaler Wirkungen begründet sein.

VII, LITERATURVERZEICHNIS

1) Aceves, J. (1977)
Sodium pump stimulation by oxytocin and cyclic AMP in the isolated epithelium of the frog skin
Pflügers Arch. 371, 211 - 216

2) Aceves, J. (1977)
Pumped movements of sodium and potassium ions in the isolated epithelium of the frog skin
Pflügers Arch. 371, 201 - 209

3) Albers, R.W., Koval, G.J., Siegel, G.J. (1968)
Studies on the interaction of ouabain and other cardioactive steroids with sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase
Mol. Pharmacol. 4, 324 - 336

4) André, R., Crabbé, J. (1966)
Stimulation by insulin of active sodium transport by toad skin: influence of aldosterone and vasopressin
Archives Internationales de Physiologie et de Biochemie, 74, 538 - 540

5) Andreoli, Th.E., Schafer, J.A. (1976)
Mass transport across cell membranes: the effect of antidiuretic hormone on water and solute
Annu. Rev. Physiol. 38, 451 - 500

6) Anner, B.M., Lane, L.K., Schwartz, A., Pitts, B.J.R. (1977)
A reconstituted Na^+-K^+ pump in liposomes containing purified (Na^++K^+)-ATPase from kidney medulla
Biochim. Biophys. Acta 467, 340 - 345

7) Ansiello, D.A., Sharp, G.W.G. (1968)
Localization of physiological receptor sites for aldosterone in the bladder of the toad, Bufo Marinus
Endocrinology, 82, 1163 - 1169

8) Baba, W.I., Smith, A.J., Townshend, M.M., (1967)
The effects of vasopressin, theophylline and cyclic 3'- 5'-adenosine-monophosphate (cyclic AMP) on sodium transport across the frog skin
Quart. J. Exptl. Physiol. 52, 416 - 421

9) Baumann, G., Loriaux, D.L. (1976)
Failure of endogenous prolactin to alter renal salt and water excretion and adrenal function in man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, 643 - 649

10) Bentley, P.J. (1960)
The effects of vasopressin on the short-circuit current across the wall of the isolated bladder of the toad Bufo Marinus
J. Endocrinol. 21, 161 - 170

11) Bentley, P.J. (1971)
Endocrines and osmoregulation
Zoophysiology and Ecology 1, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1971

12) Bern, H.A. (1975)
Prolactin and osmoregulation
Am. Zoolog. 15, 937 - 948

13) Bern, H.A. (1975)
On two possible primary activities of prolactin: osmoregulatory and developmental
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 68, 40 - 46, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1975

14) Birkinshaw, M., Falconer, I.R. (1972)
The localization of prolactin labelled with radioactive iodine in rabbit mammary tissue
J. Endocrinol. 55, 323 - 334

15) Bitensky, M.W., Burstein, S.R. (1965)
Effects of cyclic adenosine monophosphate and melalanocyte-stimulating hormone on frog skin in vitro
Nature, 208, 1282 - 1284

16) Blüm, V. (1977)
Prolaktin, Phylogenetische Aspekte
Gynäkologe, 10, 51 - 61

17) Browne, E., Clarke, D.L., Roux, V., Sherman, G.H. (1963)
The stimulation of adenosine 3'- 5'- monophosphate production by antidiuretic factors
J. Biol. Chem. 238, PC 852 - PC 853

18) Burstyn, P.G.R. (1978)
Sodium and water metabolism under the influence of prolactin, aldosterone, and antidiuretic hormone
J. Physiol. 275, 39 - 50

19) Burstyn, P.G., Horrobin, D.F., Manku, M.S. (1972)
Saluretic action of aldosterone in the presence of increased salt intake and restoration of normal action by prolactin or by oxytocin
J. Endocrinol. 55, 369 - 376

20) Butcher, R.W. (1968)
Role of cyclic AMP in hormone action
New Engl. J. Med. 279, 1378 - 1384

21) Carasso, N., Favard, P., Jard, S., Rajerison, R. (1971)
The isolated frog skin epithelium: preparation and general structure in different physiological states
J. Microscopie 10, 315 - 330

22) Carey, R.M., Johanson, A.J., Seif, S.M. (1977)
The effects of ovine prolactin on water and electrolyte excretion in man are contributable to vasopressin contamination
J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 850 - 855

23) Catt, K.J., Dufau, M.L. (1976)
Basic concepts of the mechanisms of action of peptide hormones
Biol. Reprod. 14, 1 - 15

24) Cereijido, M., Curran, P.F. (1965)
Intracellular electrical potentials in frog skin
J. Gen. Physiol. 48, 543 - 557

25) Cereijido, M. Rotunno, C.A. (1971)
The effects of antidiuretic hormone on Na movement across frog skin
J. Physiol. 213, 119 - 133

26) Ceriani, R.L. (1974)
Hormones and other factors controlling growth in the mammary gland
J. Invest. Dermatol. 63, 93 - 108

27) Chidambaram, S., Meyer, R.K., Hasler, A.D. (1972)
Effects of hypophysectomy, pituitary autografts, and prolactin on natremia in the bullhead Ictalurus Melas
Comp. Biochem. Physiol. 43 A, 443 - 457

28) Civan, M.M., Frazier, H.S. (1968)
The site of the stimulating action of vasopressin on sodium transport in toad bladder
J. Gen. Physiol. 51, 589 - 605

29) Cole, E.N., Evered, D., Horrobin, D.F., Manku, M.S., Mtabij, J.P., Nassar, B.A. (1975)
Proceedings: is prolactin a fluid and electrolyte regulation hormone in man?
J. Physiol. 252, 54 P - 55 P

30) Cowie, A.T. (1969)
Variations in the yield and composition of the milk during lactation in the rabbit and the galactopoetic effect of prolactin
J. Endocrinol. 44, 437 - 450

31) Crabbé, J. (1963)
The sodium retaining action of aldosterone
Presses Academiques Europeennes S.C. Bruxelles 1963

32) Crim, J.W. (1972)
Studies on the possible regulation of plasma sodium by prolactin in amphibia
Comp. Biochem. Physiol. 43 A, 349 - 357

33) Csaky, T.Z. (1965)
Transport through biological membranes
Annu. Rev. Physiol. 27, 415 - 450

34) Cunningham, C.C., Sinthusek, G. (1979)
Ionic charge on phospholipids and their interaction with the mitochondrial adenosine triphosphatase
Biochim. Biophys. Acta 550, 150 - 153

35) Cuthbert, A.W., Shum, W.K. (1974)
Amiloride and the sodium channel
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 281, 261 - 269

36) Davoren, P.R., Sutherland, E.W. (1963)
Cellular location of adenylate cyclase in the pigeon erythrocyte
J. Biol. Chem. 238, 3016 - 3023

37) Debnam, E.S., Snart, R.S. (1975)
Water transport response of toad bladder to prolactin
Comp. Biochem. Physiol. 52 A, 75 - 76

38) Delouis, C., Combaud, M.L. (1977)
Lack of mitotic effects of insulin during synthesis of casein induced by prolactin in pseudopregnant rabbit mammary gland organ cultures
J. Endocrinol. 72, 393 - 394

39) Devinoy, E., Houdebine, L.M., Delouis, C. (1978)
Role of prolactin and glucocorticoids on casein genes in rabbit mammary gland organ culture. Quantification of casein m-RNA
Biochim. Biophys. Acta 517, 360 - 366

40) DiBona, D.R., Civan, M.M. (1973)
Pathways for the movements of ions and water across toad urinary bladder. I. Anatomic sites of transepithelial shunt pathways
J. Membrane Biol. 12, 101 - 128

41) DiBona, D.R., Civan, M.M., Leaf, A. (1969)
The cellular specifity of the effect of vasopressin on toad urinary bladder
J. Membrane Biol. 1, 79 - 91

42) DiBona, D.R., Mills, J.W. (1979)
Distribution of Na^+-pump sites in transporting epithelia
Federation Proc. 38, 134 - 143

43) Dörge, A., Nagel, W. (1970)
Effect of amiloride on sodium transport pool and unidirectional fluxes
Pflügers Arch. 312, 91 - 101

44) Doneen, B.A., Bern, H.A. (1974)
In vitro effects of prolactin and cortisol on water-permeability of the urinary bladder of the teleost Gillichthys Mirabilis
J. Exptl. Zool. 187, 173 - 179

45) Douglas, R.R. (1978)
Seasonal changes in plasma and urinary sodium, potassium and calcium in the frog Rana Pipiens
Comp. Biochem. Physiol. 60 A, 387 - 390

46) Eigler, J. (1970)
Der Einfluß von Aldosteron auf Natriumtransport und transepithelialen Wasserfluß durch die isolierte Bauchhaut von Rana Temporaria
Pflügers Arch. 317, 236 - 251

47) Enemar, A., Essvik, B., Klang, R. (1968)
Growth promoting effects of ovine somatotropin and prolactin in tadpoles of Rana Temporaria
Gen. Comp. Endocrinol. 11, 328 - 331

48) Engbaek, L., Hoshiko, T. (1957)
Elecrical potential gradients through the frog skin
Acta Physiol. Scand. 39, 348 - 355

49) Ensor, D.M., Ball, J.N. (1972)
Prolactin and osmoregulation in fishes
Federation Proc. 31, 1615 - 1623

50) Erlij, D. (1971)
Salt transport across isolated frog skin
Phil. Trans. Roy. Soc. London, B, 262, 153 - 161

51) Falconer, I.R. (1978)
Possible mechanisms by which prolactin regulates lactogenesis and lactation
J. Endocrinol. 77, 60 P - 61 P

52) Falconer, I.R., Fiddler, T.J. (1970)
Effects of intraductal administration of prolactin, actinomycin D and cycloheximide on lipoproteinlipase activity in the mammary glands of pseudopregnant rabbits
Biochim. Biophys. Acta 218, 508 - 514

53) Falconer, I.R., Rowe, J.M. (1975)
Possible mechanism for action of prolactin on mammary cell sodium transport
Nature, 256, 327 - 328

54) Falconer, I.R., Rowe, J.M. (1977)
Effect of prolactin on sodium and potassium concentrations in mammary alveolar tissue
Endocrinology 101, 181 - 186

55) Fanestil, D.D., Vaughn, D.A. (1979)
Inhibition of short-circuit current by triaminopyrimidine in isolated toad urinary bladder
Am. J. Physiol. 236(5), C 221 - C 224

56) Farquhar, M.G., Palade, G.E. (1966)
Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis
J. Cell Biol. 30, 359 - 379

57) Ferreira, K.T.G., Hill, B.S. (1978)
Chloride dependence of active sodium transport in frog skin: the role of intercellular spaces
J. Physiol. 283, 283 - 305

58) Finn, A.L. (1971)
The kinetics of sodium transport in the toad bladder. II. Dual effects of vasopressin
J. Gen. Physiol. 57, 349 - 362

59) Finn, A.L. (1976)
Changing concepts of transepithelial sodium transport
Physiol. Rev. 56, 453 - 464

60) Förster, H. (1971)
Zyklisches Adenosinmonophosphat
Dtsch. Med. Wochenschr. 6, 251 - 256

61) Forsling, M.L. (1977)
Seasonal changes in the response to vasopressin
In: Antidiuretic Hormone, Horrobin, D.F. ed., Vol 2,
Churchill-Livingstone, London 1977

62) Frantz, A.G. (1978)
Prolactin
New Engl. J. Med. 298, 201 - 207

63) Frazier, H.S., Dempsey, E.F., Leaf, A. (1962)
Movement of sodium across the mucosal surface of the isolated toad bladder and its modification by vasopressin
J. Gen. Physiol. 45, 529 - 543

64) Friesen, H.G., Guyda, H.J., Hwang, P. (1971)
Prolactin synthesis in primates
Nature New Biol. 232, 19 - 20

65) Glynn, J.M., Karlish, S.J.D. (1975)
The sodium pump
Annu. Rev. Physiol 37, 13 - 55

66) Goldberg, N.D., Haddox, M.K., Hartle, D.K., Hadden, J.W. (1972)
The biological role of cyclic 3′-5′- guanosine monophosphate
In: Pharmacology and the Future of Man. (Proc. Intern. Congr. Pharmacol., 5th, San Francisco 1972), Karger, Vol. 5, 146 - 169, Basel 1973

67) Goldenberg, S., Warburg, M.R. (1977)
Osmoregulatory effect of prolactin during ontogenesis in two anurans
Comp. Biochem. Physiol. 56 A, 137 - 143

68) Goodfriend, Th., Kirkpatrick, J. (1963)
Effects of neurohypophysial hormones on oxidative metabolism of the toad bladder in vitro
Endocrinology, 72, 742 - 748

69) Graf, J., Giebisch, G. (1979)
Intracellular sodium activity and sodium transport in Necturus gallbladder epithelium
J. Membrane Biol. 47, 327 - 355

70) Grahame-Smith, D.G., Butcher, R.W., Ney, R.L., Sutherland, E.W. (1967)
Adenosine 3′-5′- monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotropic hormone on the adrenal cortex
J. Biol. Chem. 242, 5535 - 5541

71) Grantham, J.J. (1970)
Vasopressin: effect on deformability on urinary surface of collecting duct cells
Science, 168, 1093 - 1095

72) Harper, H.A., Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. (1975)
Physiologische Chemie
Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1975

73) Hays, R.M., Franke, N. (1970)
The role of water diffusion in the action of vasopressin
J. Membrane Biol. 2, 263 - 276

74) Hays, R.M., Leaf, A. (1962)
The state of water in the isolated toad bladder in the presence and absence of vasopressin
J. Gen. Physiol. 45, 933 - 948

75) Hegyvary, C., Post, R.L. (1971)
Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 246, 5235 - 5240

76) Heinz, E. (1963)
Physiologie, Biochemie und Energetik des aktiven Transportes
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Path. Pharm. 245, 10 - 28

77) Helbock, H.J., Sauls, H.S., Reynolds, J.N. Brown, D.M. (1971)
Effects of human growth hormone preparations on sodium transport in isolated frog skin
J. Clin. Endocrinol. 33, 903 - 907

78) Helman, S.I., Fisher, R.S. (1977)
Microelectrode studies of the active Na-transport pathway of frog skin
J. Gen. Physiol. 69, 571 - 604

79) Hirano, T. (1974)
Effect of prolactin on water and electrolyt movements in the isolated urinary bladder of the flounder Kareius Bicoloratus
Gen. Comp. Endocrinol. 22, 382

80) Hirano, T. (1975)
Effects of prolactin on osmotic and diffusion permeability of the urinary bladder of the flounder Platichthys Flesus
Gen. Comp. Endocrinol. 27, 88 - 94

81) Hirano, T., Johnson, D.W., Bern, H.A. (1971)
Control of water movement in flounder urinary bladder by prolactin
Nature, 230, 469 - 471

82) Holt, W.F., Perks, A.M. (1975)
The effect of prolactin on water movement through the isolated amniotic membrane of the Guinea Pig
Gen. Comp. Endocrinol. 26, 153 - 164

83) Hruby, V.J., Brewster, A.J., Glasel, J.A. (1971)
NMR studies on the conformation of derivatives of the side chain of oxytocin: examples of cis-trans isomerism
Proc. Natl. Acad. Sci. US 68, 450 - 453

84) Huf, E.G., Doss, N.S., Wills, J. (1958)
Effects of metabolic inhibitors and drugs on ion transport and oxygen consumption in isolated frog skin
J. Gen. Physiol. 41, 397 - 417

85) Ingleton, P.H., Batten, T.F.C., Ball, J.N. (1977)
Observations on the catecholaminergic innervation of the prolactin cells in the teleost Poecilia Latipinna
J. Endocrinol. 73, 9 P

86) Jaffee, R.B., Yuen, B.H., Keye, W.R., Midgley, A.R. (1973)
Physiologic and pathologic profiles of circulating human prolactin
Am. J. Obstet. Gynec. 117, 757 - 773

87) Jampool, L.M., Epstein, F.H. (1970)
Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and osmotic regulation by fishes
Am. J. Physiol. 218, 607 - 611

88) Jard, S., Bockaert, J. (1955)
Stimulus-response coupling in neurohypophysial peptide target cells
Physiol. Rev. 55, 489 - 536

89) Johnson, D.W., Hirano, T., Sage, M., Foster, R.D., Bern, H.A. (1974)
Hormonal control of water and sodium movements in the urinary bladder of the starry flounder, Platichthys Stellatus
Gen. Comp. Endocrinol. 19, 115 - 128

90) Johnson, D.W., Hirano, T., Sage, M., Foster, R.C., Bern, H.A. (1972)
Time course of response of starry flounder (Platichthys Stellatus) urinary bladder to prolactin and to salinity transfer
Gen. Comp. Endocrinol. 24, 373 - 380

91) Johnson, L.F., Schwartz, I.L., Walter, R. (1969)
Oxytocin and neurohypophysial peptides: spectral assignment and conformational analysis by 220 MHz nuclear magnetic resonance
Proc. Natl. Acad. Sci. US 64, 1269 - 1275

92) Josimovich, J.B., Merisko, K., Boccella, L. (1977)
Amniotic prolactin control over amniotic and fetal extracellular fluid water and electrolytes in the rhesus monkey
Endocrinology 100, 564 - 570

93) Josimovich, J.B., Merisko, K., Boccella, L., Tobon, H. (1977)
Binding of prolactin by fetal rhesus cell membrane fractions
Endocrinology, 100, 557 - 563

94) Kirchberger, M.A., Hechter, O., Walter, R., Schwartz, I.L. (1977)
Neurohypophysial peptide action on adenylate cyclase and hydroosmotic properties of toad urinary bladder epithelium
Biochim. Biophys. Acta 500, 246 - 255

95) Koefoed-Johnson, V., Ussing, H. (1958)
The nature of frog skin potential
Acta Physiol. Scand. 42, 298 - 308

96) Koninckx, P. (1978)
Stress hyperprolactinaemia in clinical practice
Lancet, 1 (8085), 273

97) Kühn, E.R., Engelen, H. (1976)
Seasonal variation in prolactin and TSH releasing activity in the hypothalamus of Rana Temporaria
Gen. Comp. Endocrinol. 28, 277 - 282

98) Lad, P.M., Reston, M.S., Welton, A.F., Nielsen, T.B., Rodbell, M. (1979)
Effects of phospholipase A_2 and filipin on the activation of adenylatecyclase
Biochim. Biophys. Acta 551, 368 - 381

99) Leaf, A., Anderson, J., Page, L.B. (1958)
Active sodium transport by the isolated toad bladder
J. Gen. Physiol. 41, 657 - 668

100) Leaf, A., Renshaw, A. (1957)
The anaerobic active ion transport by isolated frog skin
Biochem. J. 65, 90 - 93

101) Leontic, E.A., Tyson, J.E. (1977)
Prolactin and fetal osmoregulation: water transport across isolated human amnion
Am. J. Physiol. 232 (3), R 124 - R 127

102) Lewis, S.A., Wills, N.K., Eaton, D.C. (1978)
Basolateral membrane potential of a tight epithelium: ionic diffusion and electrogenic pumps
J. Membrane Biol. 41, 117 - 148

103) Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Sinha, Y.N., Vanderlaan, W.P (1971)
Electrophoretic evidence for human prolactin
J. Clin. Endocrionol. Metab. 33, 153 - 156

104) Liddle, G.W., Hardman, J.G. (1971)
Cyclic adenosine monophosphate as a mediator of hormone action
New Engl. J. Med. 285, 560 - 566

105) Lien, E.L., Goodman, D.B.P., Rasmussen, H. (1975)
Effects of an acetyl-coencym A carboxylase inhibitor and a sodium-sparing diuretic on aldosteron-stimulated sodium transport, lipid synthesis, and phospholipid fatty acid composition in the toad urinary bladder
Biochemistry 14, 2749 - 2754

106) Linzell, J.L., Peaker, M. (1971)
Mechanism of milk secretion
Physiol. Rev. 51, 564 - 597

107) Lipton, A., Leah, J., Parkington, H.C. (1978)
Effects of ovarian steroids and prolactin on the contractility and sodium pump site density of Guinea Pig myometrium
J. Endocrinol. 77, 43 - 48

108) Lodi, G., Biciotti, M., Sacerdote, M. (1978)
Osmoregulatory activity of prolactin in the skin of the crested Newt
Gen. Comp. Endocrinol. 36, 7 - 15

109) Van Loon, G.R. (1978)
A defect in catecholamine neurons in patients with prolactin-secreting pituitary adenoma
Lancet, 2 (8095), 868 - 871

110) Maffly, R.H., Edelman, I.S. (1963)
The coupling of short-circuit current to metabolism in the urinary bladder of the toad
J. Gen. Physiol. 46, 733 - 754

111) Mainoja, J.R. (1975)
Analysis of the role of endogenous prolactin on fluid and NaCl absorption by the rat jejunum
J. Endocrinol. 67, 343 - 349

112) Majumder, G.C., Turkington, R.W. (1972)
Hormone-dependent phosphorylation of ribosomal and plasma membrane proteins in mouse mammary gland in vitro
J. Biol. Chem. 247, 7207 - 7217

113) Manku, M.S., Mtabij, J.P., Horrobin, D.F. (1975)
Effect of cortisol, prolactin and ADH on the amniotic membrane
Nature, 258, 78 - 80

114) Martinez-Palomo, A., Erlij, D., Bracho, M. (1971)
Localization of permeability barriers in the frog skin epithelium
J. Cell Biol. 50, 277 - 287

115) Mattheij, J.A.M. (1977)
Evidence that prolactin plays no role in osmoregulation and sodium balance in rat
J. Endocrinol. 72, 34 P - 35 P

116) Matusik, R.J., Rosen, J.M. (1978)
Prolactin induction of casein m-RNA in organ culture. A model system for studying peptide hormone regulation of gene expression
J. Biol. Chem. 253, 2343 - 2347

117) Milhorat, T.H., Davis, D.A., Hammock, M.K. (1975)
Localization of ouabain-sensitive Na^+-K^+- ATPase in frog, rabbit and rat choroid plexus
Brain Res. 99, 179 - 174

118) Miller, M., Van Gemert, M., Moses, A.M. (1974)
Prolactin-induced antidiuresis in the rat with diabetes insipidus
Federation Proc. 33, 253

119) Mills, J.W., DiBona, D.R. (1977)
On the distribution of Na^+-pump sites in the frog skin
J. Cell Biol. 75, 968 - 973

120) Mills, J.W., Ernst, S.A., DiBona, D.R. (1977)
Localization of Na^+-pump sites in frog skin
J. Cell Biol. 73, 88 - 100

121) Møllgard, K., Rostgaard, J (1978)
Morphological aspects of sodium transporting epithelia suggesting a transcellular pathway via elements of endoplasmatic reticulum
J. Membrane Biol. 40, Sp. Is., 71 - 89

122) Morel, F. (1970)
Zyklisches Adenosinmonophosphat als intracellulärer Vermittler vieler Hormonwirkungen
Triangel 9, 119 - 126

123) Nagel, W. (1976)
The intracellular electrical potential profile of the frog skin epithelium
Pflügers Arch. 365, 135 - 143

124) Nagel, W. (1978)
Effects of antidiuretic hormone upon electrical potential and resistance of apical and basolateral membranes of frog skin
J. Membrane Biol. 42, 99 - 122

125) Nagel, W., Dörge, A. (1971)
A study of the different sodium compartments and the transepithelial sodium fluxes of the frog skin with the use of ouabain
Pflügers Arch. 324, 267 - 278

126) Nicoll, C.S. (1978)
Comparative aspects of prolactin in physiology: is prolactin the initial growth hormone in mammalian species also?
In: Progress in Prolactin Physiology and Pathology; Robyn, C. and Harter, M., eds., Elsevier, North-Holland Biochemical Press 1978

127) Nicoll, C.S., Bern, H.A. (1972)
On the actions of prolactin among the vertebrates: is there a common denominator?
In: Lactogenic Hormones; Wolstenholme, G.E.W. and Knight, J., eds., pgs. 299 - 317, Churchill-Livingstone, Edinburgh-London 1972

128) Nielsen, R. (1969)
The effect of aldosterone in vitro on the active sodium transport and moulting of the frog skin
Acta Physiol. Scand. 77, 85 - 94

129) Van Oordt, P.G., van Dougen, W.J., Lofts, B. (1968)
Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog, Rana Temporaria
Zeitschr. f. Zellforsch. 88, 549 - 559

130) Orloff, J., Handler, J.S. (1961)
Vasopressin-like effects of adenosine 3′,5′-phosphate (cyclic 3′-5′- AMP) and theophylline in the toad urinary bladder
Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 63 - 66

131) Orloff, J., Handler, J.S. (1962)
The similarity of effects of vasopressin, adenosine 3′,5′-phosphate (cyclic AMP) and theophylline on the toad urinary bladder
J. Clin. Invest. 41, 702 - 709

132) Orloff, J., Handler, J.S. (1967)
The role of adenosine 3′,5′-phosphate in the action of antidiuretic hormone
Am. J. Med. 42, 757 - 768

133) Parsons, R.H., Brady, R., Goddard, B., Kernan, D. (1978)
Seasonal effects on osmotic permeability of Rana Pipiens in vivo and in vitro
J. Exptl. Zool. 204, 347 - 352

134) Pastan, I., Roth, J., Macchia, V. (1966)
Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action
Proc. Natl. Acad. Sci. US 56, 1802 - 1809

135) Pickford, G.E., Griffith, R.W., Torretti, J., Hendlez, E., Epstein, F.H. (1970)
Branchial reduction and renal stimulation of (Na^+-K^+)-ATPase by prolactin in hypophysectomized killifish in freshwater
Nature, 228, 378 - 379

136) Platt, J.E., Christopher, M.A., Sullivan, C.A. (1978)
The role of prolactin in blocking thyroxine-induced differentiation of tail tissue in larval and neonetic Ambystoma Tigrinum
Gen. Comp. Endocrinol. 35, 402 - 408

137) Rajerison, R.M., Montegut, M., Jard, S., Morel, F. (1972)
The isolated frog skin epithelium: permeability characteristics and responsiveness to oxytocin, cyclic AMP, and theophylline
Pflügers Arch. 332, 302 - 312

138) Reuss, L., Finn, A.L. (1974)
Passive electrical properties of toad urinary bladder epithelium. Intercellular electrical coupling and transepithelial cellular and path conductances
J. Gen. Physiol. 64, 1 - 25

139) Reuss, L., Finn, A.L. (1975)
Effects of changes in the composition of the mucosal solution on the electrical properties of toad urinary bladder epithelium
J. Membrane Biol. 20, 191 - 204

140) Rick, R., Dörge, A., v.Arnim, E., Thurau, K. (1978)
Electron microprobe analysis of frog skin epithelium. Evidence for a syncytial sodium transport compartment
J. Membrane Biol. 39, 313 - 331

141) Rick, R., Dörge, A., Nagel, W. (1975)
Influx and efflux of sodium at the outer surface of frog skin
J. Membrane Biol. 22, 183 - 196

142) Rillema, J.A., Wild, E.A. (1977)
Prolactin activation of phospholipase A activity in membrane preparations from mammary glands
Endocrinology 100, 1214 - 1221

143) Robertson, G.L., Mahr, E.A., Athar, S., Sinha, T. (1973)
Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma
J. Clin. Inv. 52, 2340 - 2352

144) Roloff, C., Dörge, A., Rick, R., Thurau, K. (1978)
Effects of vasopressin on intracellular electrolyte composition of the frog skin
50th Meeting d. Dtsch. Physiol. Ges., Göttingen, 3. - 6. Oktober 1978

145) Rosen, J.M., Guyette, W.A., Matusik, R.J. (1979)
Hormonal regulation of casein gene expression in the mammary gland
In: Ontogeny of Receptors and Reproductive Hormone Action; Hamilton, T.H., Clark, J.H. and Sadler, W.A., eds., Raven Press, New York 1979

146) Rossier, B.C., Gäggeler, H.P., Rossier, M. (1978)
Effects of 3'deoxyadenosine and actinomycin D on RNA synthesis in toad bladder: analysis of response to aldosterone
J. Membrane Biol. 41, 149 - 166

147) Sage, M. (1973)
The relationship between the pituitary content of prolactin and blood sodium levels in mullet (Mugil Cephalus) transferred from sea water to fresh water
Contrib. Mar. Sci. 17, 163 - 167

148) Saito, T., Saxena, B.B. (1975)
Specific receptors for prolactin in the ovary
Acta Endocrinol. (Kbh) 80, 126 - 167

149) Sakai, S., Banerjee, M.R. (1979)
Glucocorticoid modulation of prolactin receptors on mammary cells of lactating mice
Biochim. Biophys. Acta 582, 79 - 88

150) Sapag-Hagar, M., Greenbaum, A.L. (1974)
Adenosine 3′-5′- monophosphate and hormone interrelationships in the mammary gland of the rat during pregnancy and lactation
Eur. J. Biochem. 47, 303 - 312

151) Schams, D., Himmler, V. (1978)
The effect of reduced water intake on peripheral plasma levels of prolactin in heifers
Horm. Metab. Res. 10, 360

152) Schmidt, U., Dubach, U.C. (1971)
Na-K-stimulated adenosintriphosphatase. Intracellular localization within the proximal tubule of the rat nephron
Pflügers Arch. 330, 265 - 270

153) Schultz, G. (1971)
Cyclische Nukleotide als intracelluläre Überträgerstoffe bei Hormonwirkungen
Klin. Wochenschr. 49, 1049 - 1058

154) Shiu, R.P.C., Friesen H.G. (1974)
Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland
Biochem. J. 140, 301 - 311

155) Shiu, R.P.C., Friesen, H.G. (1974)
Solubilization and purification of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland
J. Biol. Chem. 249, 7902 - 7911

156) Shiu, R.P.C., Friesen, H.G. (1976)
Blockage of prolactin action by an antiserum to its receptors
Science, 192, 259 - 261

157) Shiu, R.P.C., Kelly, P.A., Friesen, H.G. (1975)
Radioreceptorassay for prolactin and other lactogenic hormones
Science, 180, 968 - 970

158) Shome, P., Parlow, A.F. (1977)
Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence
J. Clin. Endocrinol. 45, 1112 - 1115

159) Skou, J.C. (1965)
Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membranes
Physiol. Rev. 45, 596 - 617

160) Smith, M.W., Colombo, V.W., Muma, E.A. (1968)
Influence of temperature acclimatization on the ionic activation of goldfish intestinal adenosine triphosphatase
Biochem. J. 107, 691 - 698

161) Smith, P.G. (1975)
Aldosterone-induced moulting in amphibian skin and its effect on electrical capacitance
J. Membrane Biol. 22, 165 - 191

162) Snart, R.S., Dalton, T. (1973)
Response of toad bladder to prolactin
Comp. Biochem. Physiol. 45 A, 307 - 311

163) Snyder, B.W., Frye, B.E. (1974)
Effects of prolactin and growth hormone on protein-synthesis in larval and adult frogs (Rana Pipiens)
J. Exptl. Zool. 190, 167 - 174

164) Sofroniew, M.V., Madler, M., Müller, O.A., Scriba, P.C. (1978)
A method for the consistent production of high quality antisera to small peptide hormones
Fresenius Z. Anal. Chem. 290, 163

165) Sutherland, E.W., Rall, T.W. (1958)
Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles
J. Biol. Chem. 232, 1077 - 1091

166) Sutherland, E.W., Robinson, G.A., Butcher, R.W. (1968)
Some aspects of the biological role of adenosine 3′-5′- monophosphate (cyclic AMP)
Circulation 37, 279 - 306

167) Taniguchi, K., Jida, S., (1972)
Two apparently different ouabain binding sites of (Na^+-K^+)- ATPase
Biochim. Biophys. Acta 288, 98 - 102

168) Taylor, J.C., Peaker, M., Linzell, J.L. (1975)
Effects of prolactin on ion movements across the mammary epithelium of the rabbit
Nature, 65, 26 P

169) Topper, Y.J., Green, M.R. (1971)
Some effects of prolactin, insulin, and hydrocortisone on RNA synthesis by mouse mammary gland in vitro
In: Lactation, Falconer, I.R., ed., pgs. 239 - 248, Butterworths, London 1971

170) Tormey, J.McD. (1966)
Significance of the histochemical demonstration of ATPase in epithelia noted for active transport
Nature, 210, 820 - 822

171) Tryzna, G. (1972)
Der Einfluß cyclischer Nukleotide auf die elektrische Aktivität und den transepithelialen hydroosmotischen Nettowasserfluß isolierter Amphibienmembranen
Diss. Köln 1972

172) Turkington, R.W. (1972)
Molecular biological aspects of prolactin
In: Lactogenic Hormones, Wolstenholme, G.E.W. and Knight, J., eds., pgs. 111 - 127, Churchill-Livingstone, Edinburgh-London 1972

173) Urry, D.W., Walter, W. (1971)
Proposed conformation of oxytocin in solution
Proc. Natl. Acad. Sci. US 68, 956 - 958

174) Ussing, H.H. (1949)
The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies
Acta Physiol. Scand. 17, 1 - 37

175) Ussing, H.H. (1949)
The distinction by means of tracers between active transport and diffusion
Acta Physiol. Scand. 19, 43 - 56

176) Ussing, H.H. (1960)
Transport through epithelial membranes
In: The Alkali Metal Ions in Biology, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1960

177) Ussing, H.H. (1978)
Physiology of transport regulation
J. Membrane Biol. 40, Sp. Is., 5 - 40

178) Ussing, H.H., Windhager, E. (1964)
Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium
Acta Physiol. Scand. 61, 484 - 504

179) Ussing, H.H., Zerahn, K. (1951)
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin
Acta Physiol. Scand. 23, 110 - 127

180) Utida, S., Hirano, R., Oide, M., Kamiya, M., Saisyu, S., Oide, H. (1966)
Na^+-K^+- activated adenosintriphosphatase in gills and Cl^-- activated alkaline phosphatase in intestinal mucosa with special reference to salt adaption of eels
Proc. XI Pacific Sci. Ass. Congr. 7, 5, Tokyo 1966

181) Vorherr, H. (1979)
Renal and vascular activity of prolactin preparations
Klin. Wochenschr. 57, 101 - 109

182) Vorherr, H., Vorherr, U.F., Solomon, S. (1978)
Contamination of prolactin preparations by anidiuretic hormone and oxytocin
Am. J. Physiol. 234 (4), F 318 - F 324

183) Voûte, C.L., Dirix, R., Nielsen, R., Ussing, H.H. (1969)
The effect of aldosterone on the isolated frog skin epithelium (Rana Temporaria)
Exptl. Cell Res. 57, 448 - 449

184) Vôute, C.L., Meier, W. (1978)
The mitochondria-rich cell of frog skin as hormone-sensitive "shunt-path"
J. Membrane Biol. 40, Sp. Is., 151 - 165

185) Vôute, C.L., Møllgard, K., Ussing, H.H. (1975)
Quantitative relationship between active sodium transport, expansion of endoplasmatic reticulum and specialized vacuoles ("scalloped sacs") in the outermost living cell layer of the frog skin epithelium (Rana Temporaria)
J. Membrane Biol. 21, 273 - 289

186) Vôute, C.L., Ussing, H.H. (1970)
The morphological aspects of shunt-path in the epithelium of the frog skin (Rana Temporaria)
Exptl. Cell Res. 61, 133 - 140

187) Walser, M. (1970)
Role of edge damage in sodium permeability of toad bladder and a means of avoiding it
Am. J. Physiol. 219, 252 - 255

188) Walter, R. (1971)
Conformations of oxytocin and lysine-vasopressin and their relationships to the biology of neurohypophysial hormones
In: Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones, Margoulies, M. and Greenwood, F.D., eds., pgs. 181 - 193, Excerpta Med. Found., Amsterdam 1971

189) Walter, R., Glickson, J.D., Schwartz, I.L., Havran, R.T., Meinhofer, J., Urry, D.W. (1972)
Conformation of lysine vasopressin: a comparison with oxytocin
Proc. Natl. Acad. Sci. US 69, 1920 - 1924

190) Walter, R., Schwartz, I.L., Darnell, J.H., Urry, D.W. (1971)
Relation of the conformation of oxytocin to the biology of neurohypophysial hormones
Proc. Natl. Acad. Sci. US, 68, 1355 - 1359

191) Warburg, M.R., Goldenberg, S. (1978)
The changes in osmoregulatory effects of prolactin during the life cycle of two urodeles
Comp. Biochem. Physiol. 61 A, 321 - 324

192) Waters, A.K. (1977)
Augmentation of vasopressin antidiuresis by prolactin with a note on the contamination of international standard prolactin
J. Endocrinol. 75, 435 - 436

193) Wendelaar Bonga, S E., Veenhuis, M. (1974)
The effects of prolactin on the kidney cells of the stickleback Gasterosteus Aculeatus after transfer from the sea to the fresh water and freeze-etching
Gen. Comp. Endocrinol. 22, 382

194) v.Werder, K., Felixberger, F., Gottsman, H., Kerner, W., Glöckler, B. (1978)
A homologous human prolactin (h-PRL) radioimmunoassay with an antibody against "little" h-PRL
International Atomic Energy Agency, 1, 43 - 56, Vienna 1978

195) v.Werder, K., Rjosk, H.K. (1979)
Menschliches Prolaktin
Klin. Wochenschr. 57, 1 - 12

196) Zerahn, K. (1956)
Oxygen consumption and active sodium transport in the isolated and short-circuited frog skin
Acta Pysiol. Scand. 36, 300 - 318

Lebenslauf

28. Jan. 1947	Geburt in München
Vater	Benno Knoll, Bauoberamtsrat
Mutter	Luise Knoll, geb. Buchholz, Hausfrau
1953 - 1955	Volksschule an der Franz-Nissl Straße in München
1955 - 1958	Volksschule der Barmherzigen Brüder in Algasing
1958 - 1967	Rupprecht-Gymnasium in München
1967	Abitur in München
1967 - 1973	Studium der Physik an der Technischen Universität in München
1973	Physik-Diplom an der Technischen Universität in München
1970	Verehelichung mit Eva-Maria Knoll, geb. Fleischer
1971	Geburt der Tochter Christiane Knoll
1972	Geburt der Tochter Angelika Knoll
1973 - 1978	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München
1978	Staatsexamen der Medizin und Approbation als Arzt in München
1979	Abschluß der Dissertation und Assistenzarzt an der Universitätsfrauenklinik in Göttingen

Göttingen, den 14. November 1979